

Departement Pferde der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Jörg A. Auer, MS, Diplomate ACVS/ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Diplomate ECVS

***In vivo* Studie verschiedener Hydrogele mit variabler
Porenstruktur im Vergleich**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

vorgelegt von
Karina Klein
Tierärztin
aus Siegen (Deutschland)

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. Dr. Hans Geyer, Korreferent

Zürich 2008

Meinen Eltern
Elke und Winfried Klein

&

Meinem Freund
Hubertus Willeke

In Liebe und Dankbarkeit

Zusammenfassung	1
Summary.....	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Ziel der Studie.....	3
2 Literaturübersicht.....	4
2.1 Eigenschaften eines idealen Knochenersatzmaterials.....	4
2.2 Knochenersatzmaterialien.....	6
2.2.1 Kalziumphosphatkeramiken	7
2.2.2 Komposites	8
2.2.3 Fibrinmatrix als Grundlage eines Komposites.....	8
2.2.4 Kontrastmittel als Inhaltsstoff eines Komposites	10
2.2.5 Parathormon als osteoinduktiv wirkender Mediator.....	11
3 Material und Methoden.....	13
3.1 Charakterisierung der verwendeten Hydrogele	13
3.2 Aufbau der Studie	14
3.3 Schlafmanagement.....	15
3.4 Operation	16
3.4.1 Präoperative Versorgung	16
3.4.2 Operationsablauf.....	17
3.4.3 Postoperative Versorgung.....	19
3.5 Probengewinnung und -aufbereitung.....	20
3.6 Untersuchungsmethoden und Probenauswertung.....	22
3.6.1 Radiologische Auswertung.....	22
3.6.2 Histomorphometrische Auswertung der Dickschnitte.....	23
3.6.3 Semiquantitative Auswertung der Dünnschnitte	24
3.6.4 Statistik	25
4 Resultate.....	26
4.1 Operation und postoperative Phase.....	26
4.2 Makroskopische Beurteilung der Defekte	26
4.3 Radiologische Auswertung.....	27

4.3.1	Statistischer Vergleich der verschiedenen Gruppen.....	28
4.4	Mikroradiographische Auswertung.....	30
4.5	Histomorphometrische Auswertung der Dickschnitte	30
4.5.1	Statistischer Vergleich der verschiedenen Gruppen.....	30
4.6	Histologisch-morphologische und histologisch-zelluläre Auswertung anhand der Dick- und Dünnschnitte	32
4.6.1	Gruppe A (Leerprobe).....	33
4.6.2	Gruppe B (autogener Knochenersatz)	33
4.6.3	Gruppe C (Fibrinmatrix, Kontrastmittel, 2µm MBCP, PTH)	34
4.6.4	Gruppe D (Fibrinmatrix, Kontrastmittel, 10µm TCP, PTH).....	35
4.6.5	Gruppe E (Fibrinmatrix, Kontrastmittel, PTH).....	36
4.6.6	Gruppe F (Fibrinmatrix, PTH)	36
<hr/>		
5	Diskussion	38
5.1	Ziel der Studie	38
5.2	Die Wahl eines geeigneten Versuchsmodells	39
5.3	Operation und postoperative Phase	40
5.4	Radiologische Auswertung	41
5.5	Makroskopische Auswertung.....	42
5.6	Probengewinnung und -aufbereitung	42
5.7	Histologische Auswertung	43
5.8	Schlussfolgerung und Perspektiven	46
<hr/>		
6	Literaturverzeichnis.....	47
<hr/>		
7	Abkürzungsverzeichnis	53
<hr/>		
8	Anhang	55
8.1	Abbildungen.....	55
8.2	Tabellen.....	64
<hr/>		
Danksagung.....		71
Lebenslauf.....		

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Eignung vier verschiedener Hydrogele mit variabler Porenstruktur als Knochenersatzstoffe in einem Tibiadeфекtmodell an Schafen über einen Zeitraum von 12 Wochen untersucht. Als Defekt diente eine Osteotomie der Tibiadiaphyse mit Entfernung eines 1cm großen Knochensegmentes einschließlich des umliegenden Periosts. Die Stabilisierung erfolgte mittels interner Fixation von medial sowie durch zusätzliches Anlegen eines Castverbandes. Makroskopische, radiologische, histomorphometrische und histologische Untersuchungen wurden durchgeführt und deren Ergebnisse mit denen von Leerdefekten (Negativkontrollen) und autologer Knochenspongiosa (Positivkontrollen) verglichen.

Die Grundlage der vier Komposites bestand aus einer Fibrinmatrix mit einer, kovalent an sie gebundenen, chemisch veränderten und verkürzten Form des humanen Parathormons (TGpPTH₁₋₃₄). Bei drei Hydrogelen enthielt die Fibrinmatrix eine erhöhte Thrombinkonzentration sowie ein jodhaltiges Kontrastmittel mit einem dadurch strukturell dichteren Fibrinfasergeflecht. Zwei dieser Komposites enthielten zusätzlich in die Matrix eingebettete β -Trikalziumphosphat-Granula (β -TCP) bzw. mikro- und makroporöse biphasische Kalziumphosphat-Granula (MBCP), wodurch die strukturelle Beschaffenheit nochmals deutlich erhöht wurde.

Das Hydrogel mit offener Porenstruktur lieferte mit der autologen Spongiosa vergleichbare Ergebnisse und erwies sich somit als biokompatibel mit der Fähigkeit zur Osteoinduktion und Osteokonduktion. Es lag ein sehr hoher Anteil an neugebildetem Knochen vor. Nur vereinzelt wurde noch residuale Hydrogelmatrix zwischen neugebildeten Knochentrabekeln nachgewiesen. Die drei Hydrogele mit dichter Porenstruktur, besonders die mit Zugabe der Kalziumphosphatgranula, erwiesen sich dagegen als ungeeignet für den Einsatz bei einem „critical size defect“ an der Tibia von Schafen. Für eine Fremdkörperreaktion in Form einer granulomatösen Entzündung sprachen einerseits ein großer Anteil an residualem Hydrogel ohne eingesprossete Gefäße und Zellen, andererseits konnte ein deutlich erhöhtes Auftreten von Zellen des Mononukleären Phagozytensystems in der umliegenden Umgebung beobachtet werden. In der Mehrzahl der Fälle wurde eine bindegewebige Kapsel um die Reaktionszone gebildet und bekräftigte damit den Eindruck einer Fremdkörperreaktion.

Summary

The aim of this study was to evaluate the suitability of four different Osteogenic Gels with variable pore structures as biomaterial composites in a tibial defect model in sheep after an observation period of twelve weeks. A 1cm segmental, full size diaphyseal defect was located in the midshaft of the tibia. The performance of the gels was compared to empty defects as well as to defects receiving autologous cancellous bone. After osteotomy and careful resection of the periosteum, the tibia was stabilized using an internal fixation plate. The affected hindlimb was protected with a cast to avoid spontaneous limb refracturing.

The four composites are based on a fibrin scaffold. A new chemical, bioactive and modified form of the humane PTH₁₋₃₄ (TGplPTH₁₋₃₄) was covalently linked to the matrix. The thrombin concentration was increased in three gels and an iodinated contrast agent was added. The result was a tight network of fibrin meshwork. In addition, calcium phosphate ceramics (β -TCP or MBCP) were combined with the fibrin matrix in two of those gels also increasing gel compaction.

The porous structure composition showed comparable results to the autologous cancellous bone. It combined the main characteristics required for inducing new bone formation. It was confirmed to be biocompatible, osteoinductive and osteoconductive. In contrast to these composites the three dense structured gels, especially those combined with calcium phosphate ceramics, missed osteogenic properties for healing large bone defects in the ovine tibia. By acting as a barrier for body fluids, cells, tissue and vascularisation, a high amount of remaining Osteogenic Gel induced an inflammatory response in the form of a foreign body reaction.

1 Einleitung

Es wird geschätzt, dass weltweit jedes Jahr mehr als eine Million Menschen eine chirurgische Therapie in Form von Knochentransplantatoperationen benötigen^{1,2}. Hierzu zählen verschiedene Eingriffe wie Frakturbehandlungen, posttraumatische Wiederherstellungsoperationen, Tumor-, Wirbelsäulen- und Endoprothesenchirurgie³. Es wird zwischen autogenen, allogenen und xenogenen Transplantaten⁴⁻⁷ unterschieden. Das autogene Knochentransplantat gilt bis heute als Goldstandard. Besonders bei der Rekonstruktion großer Knochendefekte hat es sich durch seine osteogenetischen, osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften und durch das Ausbleiben immunologischer Reaktionen bewährt^{4,6,8}. Aufgrund der oftmals mit der Entnahme des autogenen Knochenmaterials auftretenden Schmerzen, der limitierten Verfügbarkeit, der durch die Entnahme des Materials verlängerten Operationszeit sowie der Infektionsgefahr^{4,9-11} wird seit Jahren nach vergleichbaren Alternativen in Form von natürlichen und synthetischen Knochenersatzmaterialien gesucht.

1.1 Ziel der Studie

In dieser Studie sollte mit Hilfe eines Knochendefektmodells an der Tibia von Schafen die Eignung unterschiedlich strukturierter Hydrogele als Knochenersatzstoffe evaluiert werden. Als Negativkontrolle wurde ein Leerdefekt verwendet, als Positivkontrolle autologe Spongiosa. Das Tibiadeфекtmodell in Form eines segmentalen „critical size defects“ diente dazu, möglichst schwierige Voraussetzungen für die Knochenheilung zu schaffen und somit die Hydrogele unter Extrembedingungen zu testen. Makroskopische, radiologische, histomorphometrische und histologische Untersuchungen sollten dabei Informationen über das Ausmaß der knöchernen Regenerationsvorgänge, über das Resorptionsverhalten der eingesetzten Hydrogele sowie über zelluläre Reaktionen des umliegenden Gewebes liefern. Mit den Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen sollten Aussagen über den Grad der knöchernen Regeneration, über die Biokompatibilität und das Abbauverhalten der Hydrogele und deren Fähigkeit zur Osteointegration, Osteokonduktion und Osteoinduktion gemacht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Eigenschaften eines idealen Knochenersatzmaterials

Ein idealer Knochenersatzstoff sollte biokompatibel, bei adäquatem Knochenzuwachs biologisch abbaubar sein und über genügend Formstabilität verfügen, um einen Knochendefekt zu stützen und das normale Knochengerüst wiederherzustellen. Er sollte möglichst alle positiven Eigenschaften autologer Knochentransplantate erfüllen⁵, chemisch inert, nicht kanzerogen oder toxisch sein und keine Hypersensitivität oder Fremdkörperreaktion auslösen¹². Die jeweilige Mikrostruktur eines Knochenersatzmaterials, das heißt seine Oberfläche, sein Volumen, seine Dichte, seine Porosität und die Größe der Verbindungen zwischen den einzelnen Poren (interconnection) sind von großer Bedeutung und bestimmen grundlegend seinen Abbau und das Einwachsen von neugebildetem Knochen¹³. So kann z.B. eine hydrophobe Oberfläche eines ansonsten chemisch inerten Stoffes die Bildung einer entzündungsvermittelnden Proteinschicht fördern und dadurch eine mangelnde Biokompatibilität auslösen¹⁴. Die Porengröße und deren Verbindungen untereinander bestimmen das Eindringverhalten von Zellen sowie das Einwachsen von Gefäßen und knöcherner Strukturen. So hat sich herausgestellt, dass eine durchschnittliche Porengröße von 1µm das Eindringen von Zellen verhindert^{4,6,15}, jedoch die Immigration von Bakterien ermöglicht. Ab einem Porendurchmesser von 50 µm können Makrophagen einwandern. Die Wahrscheinlichkeit einer chronisch bakteriellen Infektion wird infolgedessen minimiert und die Infektionsresistenz maximiert^{16,17}. Knochengewebe kann hingegen erst ab einem Porendurchmesser von 100 µm einwachsen¹⁸.

Zur Entwicklung eines geeigneten Ersatzstoffes müssen viele komplexe Faktoren berücksichtigt werden. Eine gute Anpassung an das jeweilige Einsatzgebiet und die chirurgische Methode sind von großer Bedeutung.

So muss z.B. ein bei einer perkutanen Vertebroplastie (VP) eingesetzter Ersatzstoff besondere Eigenschaften besitzen. Diese Methode zählt zu den minimal invasiven chirurgischen Therapien bei Wirbelkompressionsfrakturen und stellt ein wichtiges Einsatzgebiet für Knochenersatzmaterialien dar. Der Degenerationsprozess soll aufgehalten werden, der Wirbel strukturell gestärkt und idealerweise die Bildung neuen Knochengewebes gefördert werden. Die Methode beruht auf einer perkutanen Injektion eines geeigneten Knochenersatzstoffes in die Knochenmatrix des frakturierten und

komprimierten Wirbelkörpers¹⁹. Der Ersatzstoff muss sich beim Injizieren gut zwischen den Spongiosabälkchen verteilen, ohne über definierte Grenzen zu fließen. Die Herausforderung besteht darin, ein Optimum zwischen Viskosität und Fluidität zu finden. Der Eingriff findet üblicherweise unter Durchleuchtung oder in Kombination mit einer Computertomographie statt²⁰. Ein geeignetes Kontrastmittel ist somit ein notwendiger Inhaltsstoff, damit der Verbleib des injizierten Ersatzmaterials genau bestimmt und die Gefahr späterer Nerven- oder Gewebeschäden minimiert werden kann. Da die Wirbelsäule statischen und komplexen Belastungen ausgesetzt ist, muss das Material die Fähigkeit besitzen, diesen Anforderungen standzuhalten. Es sollte elastisch und gleichzeitig formstabil sein, sowie geeignete Polymerisationseigenschaften besitzen²¹. Die Resorption muss langsam und synchron zum Knochenaufbau erfolgen, um eine Stütze der Wirbelsäule während des Remodellierungsprozesses zu gewährleisten²¹.

2.2 Knochenersatzmaterialien

Die Zusammensetzung des Körperskeletts setzt sich zu 2/3 aus anorganischen Salzen (Kalzium, Phosphate, Magnesium, Fluoride, Carbonate, Hydroxyapatit) und zu 1/3 aus organischen Bestandteilen zusammen. Mit dem größten Erfolg werden heute Knochenersatzstoffe mit vergleichbaren anorganischen und organischen Komponenten eingesetzt. Durch ihre molekularen Eigenschaften verursachen sie im Allgemeinen weniger Fremdkörperreaktionen als andere Stoffe^{16,22}. Heute verwendete Knochenersatzmaterialien basieren deshalb hauptsächlich auf Kohlenstoff, Kalzium, Silikon oder Kombinationen von diesen. Ihre Einteilung kann in fünf Gruppen erfolgen²³:

- I. Synthetisch anorganische Materialien
 - Kalziumphosphatkeramiken (Trikalziumphosphat, Hydroxyapatit)
 - Bioglas
- II. Synthetisch organische Materialien
 - organische Polymere (Polymethylmetacrylat, Polyethylenglycol)
 - Polyurethan
- III. Biologisch anorganische Materialien
 - Hydroxyapatit aus Korallen
 - chem./therm. vorbehandelte Spongiosa
- IV. Biologisch organische Materialien
 - Kollagen/Fibrinmatrix
 - Knochenmatrizen und – extrakte
 - extrahierte Knochenwachstumsfaktoren (BMP, IGF, PTH)
- V. Komposite
 - Mischungen aus den oben genannten Materialien

Bei den in dieser Studie verwendeten Hydrogelen handelt es sich um Komposites.

2.2.1 Kalziumphosphatkeramiken

Kalziumphosphatkeramiken werden seit vielen Jahren erfolgreich als Knochenersatzmaterialien eingesetzt^{1,24}. Sie sind in Form von Blöcken und Granulaten mit dichter oder poröser Struktur erhältlich. Häufig verwendet werden Hydroxyapatit (HA), β -TCP oder Kombinationen aus beiden (MBCP) und haben sich als bioaktiv und osteokonduktiv erwiesen²⁵. Ihnen wird die Fähigkeit zugeschrieben, eine feste und direkte Bindung mit dem umliegenden Knochengewebe eingehen zu können^{26,27} und dadurch als Ausgangspunkt für die Knochenneubildung zu dienen. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurden sie als biokompatibel eingestuft²⁸⁻³⁰. Für ihren Abbau sind in der Literatur zwei unterschiedliche Wege beschrieben³¹:

1) **Dissolution** (vor allem im sauren Mileu):

Die verschiedenen Phosphatkeramiken unterscheiden sich in ihrer Löslichkeit. Die geringste Zerfallsrate besitzt Hydroxyapatit^{26,32}, wodurch sein Abbau im Vergleich zu anderen Phosphatkeramiken deutlich verzögert ist.

2) **Zell-mediert**:

Abbau durch Makrophagen, Riesenzellen oder Osteoklasten.

Vorherige Studien haben gezeigt, dass das Maß an Osteokonduktivität und Bioaktivität von Phosphatkeramiken multifaktoriell beeinflusst wird. Nicht nur der verwendete Stoff an sich, sondern ebenfalls seine jeweilige Form³³ (kugelig oder fragmentartig), die Größe der Poren³⁴⁻³⁶ (Mikro- und Makroporosität), die Verbindungen zwischen den Poren³⁷, das eingesetzte Volumen und der Implantationsort können ausschlaggebend sein. Wissenschaftlich konnte belegt werden, dass der Einsatz von β -TCP am Schädel mit sehr geringem Regenerationsvermögen deutlich schlechtere Ergebnisse liefert, als im Gliedmassenbereich³⁸.

Während bei eingesetzten Keramikblöcken die Osteointegration häufig durch einen unvollständigen Kontakt zwischen Knochen und Implantat erschwert wird³⁹, besteht beim Einsatz von Granulaten die Gefahr der Migration und einer zu geringen mechanischen Stabilität^{31,40,41}, wodurch ihr Einsatz in mechanisch stark belasteten Gebieten deutlich beeinträchtigt wird. Eine Verbesserung der physikalischen Eigenschaften konnte bei Komposites aus Kalziumphosphatkeramiken kombiniert mit einer Fibrinmatrix nachgewiesen werden^{32,42,43}. Die mechanische Stabilität wurde

dadurch erhöht und aufgrund besserer Adhäsionseigenschaften eine direkte Verbindung mit den knöchernen Grenzen des Defekts erreicht.

2.2.2 Komposites

Komposites bestehen aus mehreren verschiedenen Inhaltsstoffen. Die Kombination dieser soll zu einer Verbesserung der physikalischen, mechanischen und biologischen Eigenschaften führen und eine Optimierung der Knochenersatzmaterialien erreichen. Durch verschiedene Additive lassen sich die Eigenschaften von Komposites für spezielle Anforderungen verändern. So erreicht man z.B. eine röntgendichte Struktur durch Hinzufügen von geeigneten Kontrastmitteln⁴⁴. Auch der Einsatz osteoinduktiv wirkender Mediatoren (z.B. PTH, BMP-2, TGF β), die durch sogenannte „drug delivery“ Systeme kovalent an eine Matrix (z.B. Fibrin oder Polymethylmetacrylat (PMMA)) gebunden sind, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

2.2.3 Fibrinmatrix als Grundlage eines Komposites

Fibrin ist ein biologisches, nicht zytotoxisches, resorbierbares Polymer, das bei einer Vielzahl von Operationen aufgrund seiner blutstillenden, chemotaktischen und mitogenen Eigenschaften eingesetzt wird¹. Die Bildung einer extrazellulären Fibrinmatrix entsteht durch Imitation des letzten Schrittes der Gerinnungskaskade beim Mischen der beiden Hauptkomponenten Fibrinogen und Thrombin. Die osteoinduktiven Fähigkeiten einer Fibrinmatrix als Grundlage eines Komposites und ihre Rolle bei der Knochenheilung werden kontrovers diskutiert. In einigen Studien konnte eine Verbesserung der biologischen Eigenschaften verschiedener Biomaterialien in Verbindung mit einer Fibrinmatrix nachgewiesen werden. Im Einzelnen wurden folgende Resultate dokumentiert:

- Förderung der Angiogenese im Defektbereich und dadurch bessere Vaskularisation und Bildung eines stark durchbluteten Granulationsgewebes⁴⁵
- Bildung eines natürlichen Gerüsts für Zellanhaftung und Zellwachstum^{46,47}
- In Kombination mit Wachstumsfaktoren entsteht ein positiver Effekt auf das Anfangsstadium des Knochenwachstums⁴⁸.
- In Kombination mit periostalen Knochenzellen zeigte sich innerhalb von 28 Tagen gute Knochenbildung bei einem Knochendefektmodell an Kaninchen⁴⁹.
- In Kombination mit Hydroxyapatit und Bioglas Granulaten wurden ebenfalls osteoinduktive Eigenschaften dokumentiert⁵⁰.

- In Kombination mit β -TCP und Mesenchymzellen konnte innerhalb von 8 Wochen nach intramuskulärer Injektion an Ratten ektopische Knochenbildung nachgewiesen werden⁵¹.
- In Kombination mit verschiedenen Phosphatkeramiken konnte eine Steigerung der osteogenetischen Eigenschaften beobachtet werden und somit Osteointegration, Knochenumbau und Knochenneubildung gefördert werden. Durch die Fibrinmatrix kam es zu einer Stimulation der Osteoblasten-Vorläuferzellen und mesenchymalen Stammzellen und einer dadurch bedingten Verbesserung der Osteogenese^{25,52}.

Nur bei wenigen Studien wurde ein negativer Einfluss der Fibrinmatrix auf die Osteoinduktion festgestellt:

- Eine vergleichende Studie über ein Korallen-Granulat mit und ohne Fibrinmatrix an Wirbelkörpern von Schafen zeigte nach 2 und 4 Monaten signifikant mehr Knochenneubildung ohne Zusatz von Fibrin. Bei Zusatz von Fibrin fand die überwiegende Heilung durch Bindegewebsbildung statt. Die Autoren begründeten die geringe Menge neugebildeten Knochens mit einer verminderten Anzahl von in das Komposite eingewanderten Osteoblasten-Vorläuferzellen und einer Aktivierung von Entzündungszellen durch die Fibrinmatrix⁵³.
- In vorherigen Studien konnte belegt werden, dass Fibrin in Verbindung mit deproteiniertem spongiösen Knochen vom Rind eine negative Wirkung auf die Knochenneubildung an Alveolarknochen von Hunden. Bei beiden Studien vermuten die Autoren als Ursache eine Beeinträchtigung der frühzeitigen Vaskularisation des Komposites durch die Fibrinmatrix^{54,55}.

Le Guéhennec et al. haben die These aufgestellt, dass die Mikrostruktur einer Fibrinmatrix ganz entscheidend für ihre osteoinduktiven Eigenschaften und ihre Biokompatibilität ist. So können sehr hohe Konzentrationen an Thrombin und Fibrinogen zu einer Verdichtung des Fibrinfasergeflechtes mit einer erhöhten Anzahl dicht gepackter Fibrinfaserbündel führen und somit eine Barriere für einwandernde Zellen, Gefäße und Körperflüssigkeiten darstellen³². Auch der Zusatz anderer Inhaltsstoffe kann strukturelle Veränderungen hervorrufen und somit die Eigenschaften eines Komposites unter Umständen negativ beeinflussen. So können z.B. zugefügte Kontrastmittel deutliche Veränderungen verursachen.

2.2.4 Kontrastmittel als Inhaltsstoff eines Komposites

Die Beimischung von Kontrastmitteln zu Kompositen bei orthopädischen Operationen ermöglicht eine radiologische Kontrolle der Applikation eines Biomaterials. Dies ist besonders wichtig, wenn die Gefahr einer fehlerhaften Applikation mit gravierenden Folgeschäden gegeben ist, wie z.B. bei Operationen im Wirbelsäulenbereich oder beim Einsetzen von Gelenkprothesen. Heute übliche Kontrastmittel sind Bariumsulfat und Zirkonium. Ihr Einsatz wird jedoch mit vermehrter Knochenresorption in Zusammenhang gebracht. Bei mehreren *in vitro* Studien konnte eine intensivierte Freisetzung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin-1 β und Interleukin-6 sowie osteolysefördernden Zytokinen nachgewiesen werden.^{56,57} Der Mechanismus einer Knochenresorption wird durch diese Botenstoffe induziert, indem eine gesteigerte Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten ausgelöst und die Knochenresorption direkt stimuliert wird⁵⁸. Um derartige Gewebereaktionen zu reduzieren und sowohl das damit verbundene Risiko von Implantatversagen als auch die Gefahr einer aseptischen Lockerung von Prothesen zu minimieren, besteht die Notwendigkeit, nach alternativen Kontrastmitteln zu suchen.

Seit geraumer Zeit werden wasserlösliche, jodhaltige nicht-ionische Kontrastmittel wie z.B. Iodixanol (IDX) und Iohexanol (IHX) als mögliche Alternativen getestet. Beide wurden in den letzten 20 Jahren intensiv und erfolgreich mit nur minimalen Nebenwirkungen^{59,60} in der klinischen Diagnostik, vor allem bei der Computertomographie, Angiographie⁶¹ und Urographie eingesetzt.

Sowohl IDX als auch IHX werden heute als feine, gemahlene Pulver hergestellt, damit sie Knochenzementen vor ihrer Polymerisation beigemischt werden können. Kjellson et al. konnten beim Einsatz dieser Kontrastmittel in Knochenzementen nachweisen, dass im Gegensatz zu den herkömmlichen Mitteln⁶² die mechanischen Eigenschaften des Zements nicht reduziert wurden⁶³. Wang et al. untersuchten in einer vergleichenden *in vitro* und *in vivo* Studie die zellulären Reaktionen auf einen Polymethylmetacrylat-Knochenzement kombiniert mit IDX, IHX und herkömmlichen Kontrastmitteln. Bei Verwendung von IDX bzw. IHX konnten keine nachteiligen zellulären Reaktionen festgestellt werden. Ihre bessere Biokompatibilität sowie eine verminderte Knochenresorptionsrate haben die Einsatzmöglichkeit dieser Kontrastmittel bei orthopädischen und rekonstruktiven Operationen erkennen lassen⁶⁴.

Wissenschaftlich konnte belegt werden, dass IDX und IHX Thrombose fördernde Eigenschaften besitzen, indem sie das Fibrinfasergeflecht strukturell verdichten und

damit die Thrombusbeschaffenheit verändern. Es entsteht eine unregelmässigere Struktur und eine höhere Fibrinolyseresistenz. Die einzelnen Fibrinfasern werden dünner, die Fibrinfaserbündel jedoch größer. Das Kontrastmittel bewirkt eine starke einheitliche Bindung der Antifibrinogen-Antikörper an die Faserbündel, wodurch eine hohe Anzahl dicht gepackter Fibrinfasern entsteht und die Porengröße reduziert wird⁶⁵. Dieser Einfluss auf die Porengröße eines Fibringerüsts ist in Kombination mit einem auf Fibrinbasis basierenden Hydrogel zu beachten.

2.2.5 Parathormon als osteoinduktiv wirkender Mediator

Parathormon (PTH) ist ein in der Nebenschilddrüse gebildetes Peptidhormon, bestehend aus 84 Aminosäuren. Physiologisch reguliert es die Kalziumkonzentration im Blutserum. Ein erniedrigter Serumkalziumspiegel induziert die Sekretion dieses Hormons, wodurch es zu einer vermehrten Resorption von Knochengewebe und Freisetzung von Kalzium kommt. Zusätzlich wird der Kalzium Metabolismus in der Niere gefördert.

Erste Beweise über eine Steigerung der Knochendichte durch den Einsatz von PTH wurden bereits 1929 von Bauer et al. erbracht⁶⁶. Er stellte bei einem Rattenversuch fest, dass ein deutlicher Anstieg der Knochenmasse durch tägliche PTH Injektionen möglich ist. Zu dieser Zeit waren jedoch die genaue Pathophysiologie und der Wirkungsmechanismus des PTH's noch nicht geklärt. Da vorherige Untersuchungen paradoxerweise ergeben hatten, dass Hyperparathyreodismus zu starker Knochenresorption führt, war man der Meinung, diese Ergebnisse nicht auf den Menschen übertragen zu können. Vierzig Jahre später argumentierte John Parsons als ein großer Befürworter für den Einsatz von PTH in der Osteoporosebehandlung, dass seine paradoxe Wirkung mit der Dosierung zusammenhängt. Heute ist bekannt, dass kontinuierlich hohe PTH Werte eine Osteoklastenaktivierung mit daraus resultierender Knochenresorption (katabolische PTH Wirkung) induzieren. Wohingegen kurze, intermittierend hohe Dosen den Knochenaufbau fördern (anabolische PTH Wirkung)^{67,68}. Die paradoxe Wirkung des PTHs erklärt sich dadurch, dass ausschließlich Osteoblasten einen Rezeptor zur Bindung des PTHs besitzen. Eine Aktivierung dieses Rezeptors regt die Osteoblasten zur vermehrten Knochenbildung an und zögert deren Tod hinaus. Gleichzeitig werden durch Bindung an diesen Rezeptor Botenstoffe freigesetzt, die eine Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen zu Osteoklasten bewirken. Als Folge wird eine Knochenresorption eingeleitet, die weniger

schnell eintritt, als die direkte Stimulation der Osteoblasten. Intermittierend injizierte PTH Dosen stimulieren somit die anabolische Wirkung der Osteoblasten, ohne die daran gekoppelte Osteoklastenaktivität auszulösen, wohingegen bei kontinuierlicher PTH Bindung die Osteoklastenaktivität überwiegt⁶⁹.

PTH wird bereits seit längerem erfolgreich systemisch in Form von täglichen subkutanen Injektionen, bei der Osteoporosebehandlung eingesetzt. Es kann die Erkrankung zwar nicht heilen, aber unterstützend wirken, um Knochenmasse aufzubauen, den Knochen zu stärken und die Frakturanfälligkeit zu senken⁷⁰⁻⁷⁵. Das hierzu eingesetzte synthetische PTH₁₋₃₄ (auf 34 Aminosäuren verkürzte Form des humanen PTH)⁷⁶ wird heute als Wirkstoff in Knochenersatzmaterialien zur lokalen Therapie erforscht. Vorstudien an unserem Institut haben gezeigt, dass PTH₁₋₃₄ kovalent an ein Hydrogel auf Fibrinbasis gebunden, die Knochenheilung in einem „Drill hole“ Versuchsmodell⁷⁷ an Schafen positiv beeinflussen kann⁷⁸. Seine Anwendung zur Behandlung einer kürretierten subchondralen Knochenzyste eines Pferdes bewirkte eine komplikationslose Heilung⁷⁹. Ebenfalls sehr gute Ergebnisse erzielte PTH₁₋₃₄ kovalent gebunden an eine polyethylene-glycol (PEG) Matrix in Kombination mit HA/TCP-Granula bei Versuchen an Hunden (Mandibula)⁸⁰ und Kaninchen (Calvaria)⁸¹.

3 Material und Methoden

3.1 Charakterisierung der verwendeten Hydrogele

In dieser Studie wurden vier Hydrogele mit unterschiedlicher struktureller Beschaffenheit als Knochenersatzstoff getestet. Drei von ihnen (Gruppe C, D und E) wiesen eine mehr oder weniger dichte Porenstruktur auf, wohingegen das in Gruppe F eingesetzte Gel eine offene Struktur besaß.

Die Grundlage aller verwendeten Gele besteht aus einem Fibringerüst, das sich aus Fibrinogen und Thrombin zusammensetzt. Bei der Mischung dieser beiden Hauptkomponenten kommt es durch Imitation des letzten Schrittes der Gerinnungskaskade zur Bildung einer extrazellulären Fibrinmatrix. Um eine vorzeitige Fibrinolyse zu verhindern, wird der Fibrinogenlösung Aprotinin als antifibrinolytischer Faktor hinzugefügt. Die Thrombinlösung enthält zusätzlich Kalziumionen als Kofaktor für die Gerinnungskaskade. Weitere Nebenkomponten der entstehenden Fibrinmatrix sind: Plasma Fibronectin, Faktor XIII und humanes Albumin.

Als bioaktiver und osteogenetisch wirkender Mediator dient bei allen verwendeten Hydrogelen die gleiche Menge einer chemisch veränderten und verkürzten Form des humanen Parathormons (TGplPTH₁₋₃₄) in mittlerer Konzentration. Diese modifizierte Struktur ermöglicht dem Protein, während des Gerinnungsprozesses über einen sogenannten „Aminosäure-Haken“ kovalent an die Fibrinmatrix gebunden zu werden. Durch das Einwandern verschiedener Zellen kommt es zur Proteolyse, und das Hormon wird langsam und intermittierend an die Umgebung abgegeben.

Die Fibrinmatrix der Gruppen C, D und E enthält eine höhere Thrombinkonzentration als Gruppe F sowie zusätzlich ein jodhaltiges Kontrastmittel, um die Injektion und den Verbleib des Gels radiologisch nachvollziehen zu können. Beide Inhaltsstoffe verdichten das Fibrinfasergerüst und verändern dadurch die Porenstruktur der Hydrogele. Die Komposites der Gruppen C und D enthalten zusätzlich in die Fibrinmatrix eingebettete Kalziumphosphat-Granula in unterschiedlicher Zusammensetzung und Größe (MBCP- bzw. β -TCP-Granula), wodurch die strukturelle Beschaffenheit der Gele erhöht wird.

Nähere Angaben über die Herstellung und die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Gele können an dieser Stelle aus patentrechtlichen Gründen nicht gemacht werden.

3.2 Aufbau der Studie

Für diese experimentelle Studie wurden insgesamt 35 adulte, weibliche Schweizer Alpenschafe mit einem Durchschnittsalter von 2,1 Jahren (2-3 jährig) und einem durchschnittlichen Körpergewicht von 62,1 kg (45-86 kg) verwendet.

Der Tierversuch erfolgte nach den gesetzlichen Bestimmungen des schweizerischen Tierschutzgesetzes und wurde vom kantonalen Veterinäramt bewilligt (Bewilligungsnummer: 142/2006). Der Zeitraum vom Operationstag bis zur Tötung belief sich auf 12 Wochen. Es erfolgte eine Einteilung der Tiere in 6 Gruppen zu jeweils 6 Tieren, mit Ausnahme der positiven Kontrollgruppe mit autologer Spongiosa, bei der nur 5 Tiere in den Versuch genommen wurden.

Den Versuchstieren wurde mittels Osteotomie der Tibia ein 1cm großes Knochensegment entfernt. Die Fixierung des entstandenen Defekts erfolgte mit einer 11 Loch limited contact dynamic compression plate (LC-DCP, Synthes[®], Modell 248.110, Oberdorf, Schweiz). Die Einteilung der Defektgruppen ist in der nachfolgenden Tabelle 3.1 erläutert.

Gruppe A blieb als Negativkontrolle ungefüllt. Gruppe B, mit autogener Knochenspongiosa gefüllt, diente als Positivkontrolle.

Tabelle 3.1: Überblick über die Gruppeneinteilung und das eingesetzte Material

Gruppe	Schafnummer	eingesetztes Material	Mediator
A	12117 12119 12124 12125 12137 12156	Leerprobe	
B	1275 1276 12126 12127 12128	autologe Spongiosa	
C	12138 12139 12140 12141 12142 12143	Fibrinmatrix, Kontrastmittel, 50% w/v 2µm MBCP	TGplPTH ₁₋₃₄ in mittlerer Konzentration
D	12163 12164 12165 12166 12167 12168	Fibrinmatrix, Kontrastmittel, 36% w/v 10µm TCP	TGplPTH ₁₋₃₄ in mittlerer Konzentration
E	12199 12200 12201 12202 12203 12204	Fibrinmatrix, Kontrastmittel	TGplPTH ₁₋₃₄ in mittlerer Konzentration
F	12108 12109 12110 12111 12112 12113	Fibrinmatrix	TGplPTH ₁₋₃₄ in mittlerer Konzentration

3.3 Schafmanagement

Die Gruppe der Versuchstiere setzte sich aus eigener Aufzucht und zum geringen Teil aus gekauften Tieren zusammen. Beim Ankauf neuer Tiere wurden diese gründlich untersucht und das Alter anhand ihrer Zähne bestimmt. Zum Ausschluss einer Trächtigkeit erfolgte eine transabdominale und rektale Ultraschalluntersuchung. Tragende Tiere wurden von der Studie ausgeschlossen und kamen zum Ablammen in eine gesonderte Herde. Mittels eines Vacutainer-Systems (Bellivier Industrial Estate, Plymouth, Großbritannien) wurde Blut aus der Vena jugularis entnommen, um es am Virologischen Institut der Vetsuisse-Fakultät Bern serologisch auf Maedi/Visna-

Antikörper untersuchen zu lassen. Als positiv bewertete Tiere wurden nicht in die Herde aufgenommen, sondern der zuständigen Behörde gemeldet und umgehend geschlachtet. Ebenfalls vom Ankauf ausgeschlossen wurden Tiere mit reduziertem Allgemeinbefinden, bestehenden Verletzungen und ansteckenden Krankheiten. Als gesund beurteilte Tiere wurden mit bestandseigenen Ohrmarken gekennzeichnet und einer Klauenpflege unterzogen. Die antiparasitäre Behandlung erfolgte mit einer subkutanen Injektion von Doramectin (Dectomax[®], 0,2 mg/kg, Pfizer AG, Zürich, Schweiz) zur gleichzeitigen Bekämpfung von Endo- und Ektoparasiten, sowie einer oralen Eingabe von Netobimin (Hapadex[®] 5%, 4ml/10kg, Berna Veterinärprodukte AG, Bern, Schweiz). Weitere Entwurmungen wurden viermal jährlich mit alternierendem Einsatz verschiedener Antiparasitika durchgeführt. Eine Impfung gegen die verschiedenen Clostridien- und Pasteurelleninfektionen erfolgte mit Ovilis[®] Heptavac P ad us. vet. s.c. (2ml, Veterinaria AG Zürich, Schweiz). Die Grundimmunisierung war nach einer Wiederholung der Impfung nach 4-6 Wochen abgeschlossen. Spätere Impfauffrischungen mussten infolgedessen nur noch einmal jährlich vorgenommen werden.

Alle Tiere des Bestandes wurden zweimal jährlich (Frühjahr und Herbst) geschoren und alle sechs Wochen einer gründlichen Klauenpflege unterzogen, bei der gleichzeitig der Gesundheitstatus geprüft wurde.

3.4 Operation

3.4.1 Präoperative Versorgung

Zwei Wochen vor dem Operationstermin wurden die Tiere zur Eingewöhnung in einen dem Tierspital nahegelegenen Stall gebracht. Um die Operationsrisiken zu minimieren und eventuelle Vorerkrankungen auszuschließen, wurden sie einige Tage vor der Operation klinisch untersucht und ihr Blut sowohl einer hämatologischen (kleiner Status aus EDTA-Blut) als auch blutchemischen Untersuchung (Substrate, Enzyme, Elektrolyte aus Serum) unterzogen. Einige Tage vor dem geplanten Eingriff wurden die Schafe gewogen und sowohl im Bereich des Operationsfeldes (das jeweils zu operierende Hinterbein einschließlich Kniefalten- und Unterbauchbereich) als auch die gegenüberliegende Halsseite großflächig geschoren. Futterentzug erfolgte 24 Stunden vor der Operation bei freiem Zugang zu Wasser.

3.4.2 Operationsablauf

Ca. 30 Minuten vor Beginn der Operation wurden die Schafe nach präanästhetischer Untersuchung in Form von Herz- und Lungenauskultation sowie rektaler Temperaturmessung durch intramuskuläre Injektion von Xylazin (Rompun® 2%, 0,1mg/kg, Provet AG, Lyssach, Schweiz) und Buprenorphin (Temgesic®, 0,01mg/kg, Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) sedativ und analgetisch prämediziert. Unter Lokalanästhesie und nach aseptischer Vorbereitung wurde ein Venenverweilkatheter (Vygonüle S® G14, Vygon GmbH; Aachen, Deutschland) in die Vena jugularis gesetzt. Zur peri- und postoperativen Infektions-, Schmerz- und Entzündungsprophylaxe erhielten die Tiere intravenös als Antibiose Benzylpenicillin (Penicillin Natrium Streuli ad us vet., 35000 I.U./kg, G.Streuli&Co AG, Uznach, Schweiz) und Gentamicin (Vetagent®, 4mg/kg, Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) sowie als nichtsteriodales Antiphlogistikum Carprofen (Rimadyl®, 4mg/kg, Pfizer AG, Zürich, Schweiz). Zusätzlich wurde prophylaktisch equines Tetanustoxin s.c. (Tetanus-Serum Intervet®, 3000 I.U., Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) injiziert.

Die Einleitung der Anästhesie erfolgte durch intravenöse Injektion von Ketamin (Narketan 10®, 2mg/kg, Vetoquinol AG, Belp-Bern, Schweiz) und Diazepam (Valium®, 0,1mg/kg, Roche Pharma AG, Rheinach, Schweiz). Bei Bedarf kam zusätzlich Propofol (Propofol® 1% Fresenius, 2-4 mg/kg i.v., Fresenius Kabi AG, Stans, Schweiz) zum Einsatz. Nach erfolgter endotrachealer Intubation wurde die Narkose mit 1-1,5% Isofluran-Sauerstoff-Inhalation (Forene®, Abbott AG, Baar, Schweiz) aufrechterhalten und das Tier in Seitenlage positioniert. Über die gesamte Dauer der Operation erhielten die Tiere Infusionen in Form von Ringer-Laktat-Lösung (10ml/kg/h). Das Monitoring der Narkose erfolgte mit Hilfe von Pulsoxymetrie, Kapnographie, EKG und Blutdruckmessung.

Das Operationsfeld wurde nach standardisierter Vorgehensweise gewaschen, entfettet, desinfiziert und steril abgedeckt. Der operative Zugang der Tibiadiaphyse erfolgte von medial. Der Schnitt reichte von distal des Kniegelenkes bis kurz proximal des Tibiotarsalgelenkes. Blutungen wurden mittels eines Elektrokauters gestillt und der Knochen nach Durchtrennung der oberflächlichen und tiefen Faszie ohne Verletzung des Periosts dargestellt. Mit Hilfe eines Plattenbiegers (Synthes®, Oberdorf, Schweiz) wurde eine 11 Loch (3,5mm) LC-DC Platte (LC-DCP, Synthes®, Modell 248.110, Oberdorf, Schweiz) der Tibia so angepasst, dass ihr distales Ende bis ca. zwei Zentimeter proximal des Tibiotarsalgelenkes reichte. Die Befestigung der Platte am

Knochen erfolgte mit elf 3,5 mm Korticalisschrauben (Synthes[®], Modell 204.022-032, Oberdorf, Schweiz), 6 Schraubenlöcher proximal und 5 distal des geplanten Osteotomiespaltes. Bis auf die beiden defektnahen Schrauben wurden alle Löcher vor Durchführung der Osteotomie gebohrt, die Schraubenlänge gemessen und das Gewinde geschnitten. Um eine Distraction des Osteotomiespaltes zu erreichen, wurden die 5. und 8. Schraube exzentrisch gebohrt, alle anderen in neutraler Position. Unter Verwendung einer Schieblehre wurde anschließend der 1cm große standardisierte Defekt mit Hilfe des Elektrokauters auf dem Knochen angezeichnet. Nach Entfernung der Platte wurde die Osteotomie mit einer oszillierenden Säge (Synthes[®], Modell 518.010, Sägeblatt Modell 312.280, Oberdorf, Schweiz) unter konstanter Spülung mit steriler 0,9% Kochsalzlösung durchgeführt. Zum Schutz des umliegenden Gewebes kamen sowohl von kranial als auch von kaudal der Tibia Hohmannhebel zum Einsatz (Abb.1). Nach Entfernung des Knochensegmentes einschließlich des Periosts in der Defektumgebung sowie Stillung der Blutungen vom Knochenmark und dem umliegenden Gewebe, wurde die Platte repositioniert, die letzten beiden Schraubenlöcher gebohrt und alle Blutgerinnsel und Knochenrückstände aus dem Osteotomiespalt entfernt (Abb.2). Wie bereits unter 3.2 erläutert, wurde der Defekt bei der negativen Kontrollgruppe nicht gefüllt. Das autogene Knochenmaterial der positiven Kontrollgruppe wurde nach Präparation des gegenüberliegenden Beckenkammes mit Hilfe eines scharfen Löffels entnommen und der Defekt gefüllt. Bei den Hydrogelgruppen wurde eine standardisierte Menge mittels Spritze appliziert und der Osteotomiespalt retrograd vollständig gefüllt. (Abb.3)

Anschließend erfolgte der Verschluss der medialen Faszia routinemäßig mit einer einfachen Naht nach Kürschner unter Verwendung eines resorbierbaren Nahtmaterials (Polyglactin, 2-0 Vicryl[®], Johnson & Johnson Int., Brüssel, Belgien). Die Wundränder wurden mit einer einfachen fortlaufenden Subkutannaht angenähert und die Haut mit Hilfe eines Staplers (Auto Suture Appose ULC[®], United States Surgical, Norwalk, USA) als letzte Schicht geheftet. Die Tiere erhielten eine projektbezogene Ohrmarke, und ein Mikrochip (RID[®]RF-Identification Technology, Data Mars AG, Lugano, Schweiz) wurde an der linken Halsseite implantiert.

Es folgte die routinemäßige Anfertigung von postoperativen Röntgenbildern (mobiles Röntgengerät, 62KV, 2,5mAS) in zwei Ebenen (mediolateraler und kaudokranieler Strahlengang).

Zur Immobilisierung der gesamten Extremität und zur Verringerung der auf die Tibia wirkenden Dreh- und Scherkräfte wurde ein Castverband angelegt. Zunächst erfolgte die Abdeckung der Wunde mit einer sterilen Saugkompressen (Mesorb[®], Mölnlycke Health Care AG, Göteborg, Schweden). Die Gliedmaße wurde unter Einbeziehung der Klaue und des Kniegelenkes mit unbeschichteter Watte gepolstert, mit einer elastischen, selbsthaftenden Binde (Elastomull[®] Haft, BSN medical GmbH & Co., Hamburg, Deutschland) fixiert und mit Krepp-Papierbinden (Cello-Crêpe[®], IVF Hartman AG, Neuhausen, Schweiz) umwickelt. Danach wurden 3-4 Castbinden (Scotch Cast[®] Plus, 7,6cm, Laboratoires 3M Santé, Frankreich) zirkulär gewickelt, um die Stabilität des Verbandes zu gewährleisten. Zum Schutz vor Feuchtigkeit wurde eine Pflasterbinde (Isoelast[®], IVF Hartmann AG, Neuhausen, Schweiz) über den Verband gewickelt und deren Enden mit Klebeband (Tesa[®] AG, Hamburg, Deutschland) fixiert.

3.4.3 Postoperative Versorgung

Nach Ausleitung der Narkose und Extubation erfolgte der Transport der Tiere in einen nahegelegenen Stall und die Unterbringung in Einzelboxen (1 x 2m) mit einem speziell entwickelten Hängesystem (designed von Ruedi Keller, Equine Hospital, Rescue group. Vetsuisse-Fakultät Zürich). Das System ermöglicht den Tieren, die Beine zu entlasten, ohne sich komplett niederzulegen. Ruckartige Bewegungen werden kompensiert und dadurch einer Deformation der Platte und einer Refraktur der Tibia vorgebeugt. Die bereits präoperativ begonnene antibiotische und antiphlogistische Therapie wurde über einen Zeitraum von vier Tagen über den Venenverweilkatheter weitergeführt. Die Injektionen erfolgten bei Benzylpenicillin (30.000 I.U./kg) alle 12 Stunden und bei Gentamicin (4mg/kg) und Carprofen (4mg/kg) alle 24 Stunden. Die Schmerztherapie mit Buprenorphin i.m. (0,01 mg/kg) wurde noch zweimal im Abstand von 4 Stunden wiederholt. Über einen Zeitraum von 4 Wochen blieben die Tiere in den Hängesystemen. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Heu und Sichtkontakt zu ihren Artgenossen. Kot- und Urinabsatz war ohne Beeinträchtigung möglich. Nach Ablauf der 4 Wochen wurden sie für den Rest der Studie in Gruppen von 2-3 Tieren in größere Boxen (4 x 6m) umgestellt. Zweimal täglich erfolgte eine Kontrolle ihres Allgemeinbefindens, dabei wurde der Sitz von Hängernetz und Verband überprüft. Weitere Röntgenbilder (mobiles Röntgengerät, 64KV, 2,5mA) wurden ohne Abnahme des Verbandes nach 1, 4 und 8 Wochen am sitzenden Schaf ohne Sedation angefertigt (mediolateraler und kraniokaudaler Strahlengang).

Soweit keine Druckstellen oder Schwellungen der Gliedmasse vorhanden waren, wurden die Verbände alle 4 Wochen gewechselt und währenddessen eine Klauenpflege durchgeführt. Während des ganzen Studienzeitraumes verblieb das operierte Bein in einem Castverband. Beim Verbandswechsel nach 4 Wochen erfolgte die Entfernung der Wundklammern. Nach 8 Wochen wurde die Klaue beim Verbandswechsel freigelassen, um eine physiologischere Belastung des Beines zu ermöglichen.

3.5 Probengewinnung und -aufbereitung

Die Tiere wurden nach 12 Wochen durch Bolzenschuss betäubt und durch Blutentzug getötet. Die zu untersuchende Tibia wurde aus den umliegenden Weichteil- und Knochenstrukturen herausgelöst und die Osteosyntheseplatte freipräpariert. Mit Hilfe einer Digitalkamera (Sony Cyber-shot DSC-R1, Sony Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) erstellte Fotografien dienten zur Dokumentation der makroskopisch sichtbaren Heilungstendenz des Defekts:

- Übersichtsaufnahme mit Platte von medial
- Detailaufnahme des Osteotomiespaltes von medial
- Detailaufnahme des Osteotomiespaltes von kaudal

Im Anschluss wurden Makroradiographien mit einem Faxitron (55KV, 5s, Cabinet x-ray-faxitron series, model 43855A, Hewlett Packard[®], Mc Minville Division, Oregon, USA) in zwei Ebenen (mediolateraler und kраниokaudaler Strahlengang) angefertigt. Mit Hilfe einer Bandsäge (Kolbe[®] Maschinentechnik GmbH, Elchingen, Deutschland) wurde die Tibia zwischen dem fünften und sechsten, sowie dem siebten und achten Schraubenloch durchtrennt, so dass ein Knochenstück mit Defekt und benachbarten Schraubenlöchern isoliert werden konnte. Zur Fixierung kamen die Proben für mindestens 7 Tage in beschriftete Gläser mit 4%iger gepufferter Formalinlösung. Im Abstand von mindestens zwanzig Minuten erfolgte ein viermaliges Waschen mit entionisiertem Wasser. Die Entwässerung wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe durchgeführt:

- 3 x 30 Minuten in 50% Ethanol
- 2 x 12 Stunden in 70% und 80% Ethanol
- 1 x 12 Stunden in 90% und 96% Ethanol
- 3 x 12 Stunden in 100% Ethanol

Zur Entfettung kam Xylol über einen Zeitraum von 4 Tagen zum Einsatz. Um ein ausreichendes Durchtränken der Proben zu gewährleisten, wurden sie ab diesem Zeitpunkt im Vakuum gelagert. Nach zweimaligem Wechseln des Xylols wurden sie in noch flüssiges Methylmetacrylat (MMA) verbracht und bei 4°C eine Woche lang infiltriert. Die Herstellung des Metacrylats wurde nach vorgegebenem Schema durchgeführt: Methacrylacid-methylester (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Dibutylphthalat (Merck-Schuchardt® OHG, Hohenbrunn, Deutschland) und Perkadox 16 (Dr. Grogg Chemie AG, Stetten, Schweiz) wurden im Verhältnis 89,5:10:0,5 gemischt und 15 Minuten lang mit einem Magnetrührer homogenisiert. Nach der einwöchigen Infiltration im MMA fand die Einbettung statt. Hierzu wurde die Probe auch innerhalb des Glases mit der jeweiligen Projektnummer beschriftet (weiße Pappe, Bleistift), so dass über den gesamten Bearbeitungszeitraum eine eindeutige Identifikation gewährleistet war. Die Gläser wurden zur Polymerisation erneut ca. eine Woche bei 4°C in den Kühlschrank und anschließend in ein unbeheiztes Wasserbad gestellt. Nach vollständiger Polymerisation wurden sie für ein bis zwei Tage bei 37,5°C in einem Wärmeschrank gelagert. Um die Blöcke gut aus den Gefäßen entfernen zu können, wurden sie für mehrere Stunden gefrostet und die Gläser anschließend mit einem Gummihammer zerschlagen. Mit Hilfe der Bandsäge erfolgte die Verkleinerung der Proben auf eine angemessene Größe.

Die entstandenen Blöcke wurden mit Plastikrahmen beklebt (Historesinplastikkleber, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) und neben der projektbezogenen Tiernummer zusätzlich mit einer Histologienummer beschriftet. Die Blöcke konnten danach zur Herstellung der Dickschnitte (400µm Stärke) in eine Sägevorrichtung (Präzisionsinnenlochsäge, Leica® SP1600, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) eingespannt werden. Die Schnittfläche verlief längs zum Knochen auf Höhe des maximalen Diaphysendurchmessers und beinhaltete den Defekt und idealerweise beide benachbarten Schraubenlöcher.

Die angefertigten Schnitte wurden mit 70%igem Alkohol gereinigt und in Zellstoff zwischen zwei Metallplatten gelegt. Dort konnten sie über Nacht nachtrocknen und durch das Gewicht der Platten geglättet werden. Am darauffolgenden Tag wurde mit einem hochauflösenden Film (Fuji Photo Film Co.®, Ltd. Tokyo, Japan) eine Mikroradiographie im Faxitron (27KVp, 11s) angefertigt und die Dickschnitte anschließend mit einem Schnellkleber (Cementit® CA 12, Merz + Benteli AG, Niederwangen, Schweiz) auf weiße Acropalträger aufgeklebt und beschriftet.

Mit Hilfe einer Schleif- und Poliermaschine (Exakt[®] Mikroschleifsystem 400 CS, Exakt Aparatbau GmbH, Norderstedt, Deutschland) wurden sie auf eine Dicke von ca. 300µm abgeschliffen. Es erfolgte eine Oberflächenfärbung mit Toluidinblau.

Zur Anfertigung der Dünnschnitte wurde der restliche Block mit einer kleinen Bandsäge (PROXXON[®] Typ MBS 230/§ NO 27170, Niersbach, Deutschland) erneut zugeschnitten, so dass die Probe in kleine, speziell angefertigte und luftdichte Teflonformen (maßgefertigt von D. Nadler, Jossi AG, Islikon, Schweiz) eingebettet werden konnte. Nach Aushärtung, Aufkleben der Plastikrahmen und Beschriften waren die Proben zum Sägen bereit. Mit der Innenlochsäge wurden sie präzise angeschnitten, so dass mit einem Hartschnittmikrotom (Leica[®] RM 2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) 5-7µm dünne Schnitte angefertigt werden konnten. Nach Entplastifizierung mit Methoxyethyl-acetat (Merck, Schweiz AG) wurde je ein Dünnschnitt mit Toluidinblau und einer mit van Kossa Färbung mit McNeals Tetrachrom Gegenfärbung gefärbt.

3.6 Untersuchungsmethoden und Probenauswertung

3.6.1 Radiologische Auswertung

Die postoperativen Röntgenaufnahmen dienten zur Kontrolle der durchgeführten Osteotomie und sofern möglich dem Nachweis des eingesetzten Knochenersatzstoffes. Die nach 4, 8 und 12 Wochen (post mortem, Makroradiographie mittels Faxitron) angefertigten Röntgenbilder wurden von zwei Radiologen während einer Sitzung mittels eines semiquantitativen Scoresystems beurteilt und anschließend statistisch ausgewertet. Falls sich die Scoringergebnisse der beiden Radiologen unterschieden, wurde der Mittelwert notiert und für die Statistik verwendet. Um die Auswertung unvoreingenommen durchführen zu können, war den Radiologen die Gruppenzugehörigkeit der jeweiligen Schafe nicht bekannt (blind session). Ausgewertet wurden das kortikale Knochenwachstum einschließlich der Kallusbildung an Cis- und Trans-Kortex aller Gruppen und, falls radiologisch erkennbar, die Residualmenge des eingesetzten Ersatzstoffes im Bereich des Osteotomiespaltes. Es wurde folgendes semiquantitatives Scoresystem erstellt:

Knochenwachstum und Kallusbildung auf Cis- bzw. Trans-Kortex:

0	Keine periostale und endostale Kallusbildung an den Kortizes
1	Geringgradige peri- u/o. endostale Kallusbildung, nicht in den Osteotomiespalt hineinreichend
2	Peri- u/o. endostale Kallusbildung, in den Osteotomiespalt hineinreichend
3	Peri- u/o endostale Kallusbildung mit kompletter Überbrückung (bridging) des Osteotomiespals

Erkennbares residuales Material:

0	Deutlich erkennbar, fast komplett ausgefüllter Osteotomiespalt
1	Erkennbar, aber Osteotomiespalt nur teilweise ausfüllend
2	Keine Materialreste erkennbar

3.6.2 Histomorphometrische Auswertung der Dickschnitte

Die mit Toluidinblau gefärbten Dickschnitte wurden mit Hilfe eines Makroskops (Leica[®] M420, Leica-microsystems, Glattdbrugg, Schweiz), einer Digitalkamera (Leica DC 200[®]) und entsprechender Software (Leica IM 1000[®]) in einen Computer eingelesen und im TIF-Format gespeichert. Anschließend kam eine bildbearbeitende Software (Adobe Photoshop[®] 7.0) zur Anwendung, um die verschiedenen Bereiche der Probe zu detektieren und anzufärben. Es wurde ein standardisierter Bereich für die Messung ausgewählt. Er belief sich auf die Größe des 1cm großen Defekts und zusätzlich einer 0,5cm breiten Randzone einschließlich der Osteotomieenden. Die verschiedenen Gewebe wurden folgendermaßen angefärbt:

- Alte Knochenmatrix → cyanblau
- Neue Knochenmatrix → waldgrün
- Hydrogel → beige
- Hintergrund → schwarz
- Fibröses Gewebe → pink

Die als fibröses Gewebe detektierte Fläche setzte sich aus mesenchymalem und vaskulärem Gewebe einschließlich des Knochenmarks und Zonen aktiver Hydrogelresorption zusammen. Durch das Anfärben der für die Auswertung relevanten Strukturen mittels Photoshop konnte eine fehlerhafte Detektion durch die

Auswertungssoftware (Leica Qwin[®], Leica Quips[®]) ausgeschlossen und die von dem jeweiligen Gewebe eingenommenen Flächen berechnet werden. Eine Fehlmessung wurde durch zwei Kontrolldurchgänge verhindert. Die anschließende Umrechnung der gemessenen Flächen in ihre Prozentanteile erfolgte mit Hilfe von Microsoft[®] Excel.

3.6.3 Semiquantitative Auswertung der Dünnschnitte

Die histologische Auswertung der Dünnschnitte erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops der Firma Leica (Leica[®] MDL 404097) bei vier verschiedenen Vergrößerungen (5fach, 10fach, 20fach, 40fach). Die semiquantitative Auswertung der Schnitte wurde mittels eines vierstufigen Bewertungssystems („Scoresystem“) durchgeführt. Als Untersuchungsparameter wurden fünf verschiedene Zelltypen (mononukleäre Zellen, Makrophagen, mehrkernige Riesenzellen, Osteoklasten und Fibroblasten/-zyten) ausgewählt und ihr Vorkommen in sieben verschiedenen Zonen des Defekts subjektiv bewertet. Berücksichtigt wurde der Anteil der verschiedenen Zelltypen, die sich bei 10facher Vergrößerung im Gesichtsfeld befanden. Die Bewertung erfolgte an den in Abb.3.1 gekennzeichneten Zonen.

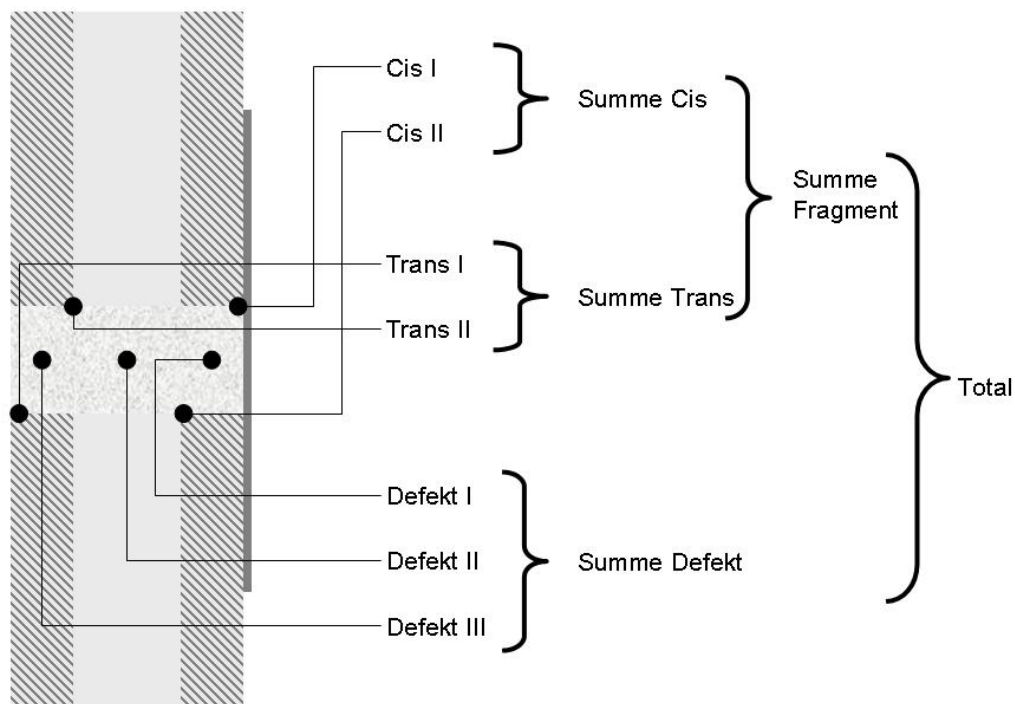


Abbildung 3.1: Zoneneinteilung für die semiquantitative Auswertung der Dünnschnitte

Das Scoresystem wurde für die einzelnen Zelltypen folgendermaßen erstellt:

Mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten), Makrophagen und Fibroblasten/-zyten:

Score	Prozentualer Anteil der Zellen im Gesichtsfeld
0	0%
1	1-25%
2	26-50%
3	>50%

Da Osteoklasten und mehrkernige Riesenzellen einen wesentlich größeren Teil des Gesichtsfeldes ausmachen, erfolgte bei ihnen die Score-Einteilung anhand der absoluten Zahlen:

Score	Absolute Anzahl der Zellen im Gesichtsfeld
0	0
1	1-5
2	6-10
3	>11

Um die statistische Analyse übersichtlicher zu gestalten, wurden ausschließlich die Summen von Cis- und Trans-Kortex, die Summe beider Fragmente, die Summe des Defekts und die gesamte Summe jedes Zelltyps in die Statistik einbezogen (Abb. 3.1).

3.6.4 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms (SPSS[®] Base für Mac OS X, Version 13.0, Chicago, Illinois). Die quantitativen Daten der Histomorphometrie und die semiquantitativen Daten der Scoresysteme (Dünnschnitte und Radiologie) wurden einer faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen und die Daten der deskriptiven Statistik wie Mittelwerte und ihre Standardabweichungen ermittelt. Post Hoc Tests wurden nach Scheffe und Bonferroni durchgeführt. Da sich keine gravierenden Unterschiede zwischen den beiden Tests zeigten, wurde zur endgültigen Auswertung der Signifikanzen nur der Test nach Scheffe herangezogen. Als statistisch signifikant angesehen wurden p-Werte < 0.05 . Zur Ermittlung der Korrelationen verwendete man die Auswertung nach Pearson.

4 Resultate

4.1 Operation und postoperative Phase

Alle Operationen konnten wie geplant durchgeführt werden. Bei einem Schaf (Nr.12164) brach beim Anfertigen des siebten, defektnahen Schraubenloches die Spitze des Bohrers ab. Da eine Entfernung dieser nicht möglich war, wurde sie im Bohrkanal belassen und eine kürzere Kortikalisschraube eingesetzt.

Die Entnahme des bei Gruppe B eingesetzten autogenen Knochenmaterials erfolgte aus dem gegenüberliegenden Beckenkamm. Sowohl das Einbringen des Materials als auch die Wundheilung der Entnahmestellen verliefen bei allen Tieren komplikationslos. Das angemischte, zunächst visköse Hydrogel ließ sich ebenfalls problemlos in den Defekt applizieren. Bei Gruppe C und D härtete es schnell aus und erhielt eine elastische, aber formfeste Konsistenz und füllte den Defekt als kompakte, weiße Masse komplett aus. Im Fall von Gruppe E und F erschien das Material makroskopisch weniger strukturiert, aber elastischer als bei Gruppe C und D. Die mediale Faszie und die Unterhaut konnten bei allen Gruppen vernäht werden, ohne die Oberflächenbeschaffenheit des Gels zu verändern.

Die Aufwachphase und der Transport zu den Stallungen verliefen bei allen Tieren komplikationslos. Sowohl das Hängesystem als auch die Castverbände wurden gut toleriert. Bereits unmittelbar nach dem Erwachen nahmen die Schafe Nahrung auf. Die operierte Gliedmaße wurde nur die ersten 1-2 Tage minimal entlastet. Bis zu 8 Wochen nach der Operation wurde bei den Tieren der positiven Kontrollgruppe ein vergleichsmäßig häufigeres Liegen festgestellt. Es kam zu keinerlei Wundinfektionen, so dass bei allen Tieren eine Primärheilung erreicht werden konnte.

4.2 Makroskopische Beurteilung der Defekte

Die Lokalisation des gesetzten Defekts war 12 Wochen nach der Operation bei allen Proben ersichtlich. Es konnte unterschiedlich starke Kallusbildung beobachtet werden, die eine Entfernung der Platte jedoch nicht behinderte. Bei der negativen Kontrollgruppe, wie auch bei den Gruppen C und E zeigte sich bei dem größten Teil der Proben eine mechanische Instabilität der Osteotomieenden. Diese konnten deutlich gegeneinander bewegt werden und wurden nur bindegewebig zusammengehalten. Bei Gruppe C war in 5 Proben überwiegend im Bereich der Trans-Kortex residuales Hydrogel als kompakte weiße Masse erkennbar (Abb.4). Bei Gruppe D kam es im

Bereich der Cis-Kortex zu stärkerer Kallus- und Knochenneubildung als bei den zuvor genannten Gruppen, wodurch diese Proben eine geringgradig verbesserte Stabilität aufweisen konnten. Makroskopisch erkennbare Hydrogelmatrix zeigte sich hier ausschließlich bei einer Probe (Nr.12165) an der Trans-Kortex mit dem gleichen Erscheinungsbild wie bei den Proben der Gruppe C. Bei der positiven Kontrollgruppe sowie bei Gruppe F waren bei dem größten Teil der Proben die Osteotomieenden stabil und nicht gegeneinander verschieblich. Es kam zu teilweise deutlicher Kallusbildung mit Überbrückung des Defekts. Auf biomechanische Tests wurde verzichtet. Makroskopisch ersichtliche Anzeichen einer Infektion konnten nicht gefunden werden.

4.3 Radiologische Auswertung

Auf den postoperativen Aufnahmen erwiesen sich bei allen Tieren die Lage der Osteotomieenden zueinander und die Position der Platte als korrekt. Folgende Röntgenbefunde wurden in der Gruppe A im Verlauf erhoben: Nach 4 Wochen war eine leichtgradige Abrundung der Osteotomieenden und geringe Weitung des Osteotomiespalt es erkennbar ohne radiologisch sichtbaren Kallus. Diese Befunde bestätigten sich nach 8 Wochen. Auf der Makroradiographie nach 12 Wochen wurde bei 5 Tieren sehr wenig bis wenig knöcherner, nicht überbrückender periostaler und endostaler Kallus im Bereich der Osteotomie an beiden Kortizes beobachtet. Insgesamt wurde die Heilung der Osteotomie bei diesen Schafen der Gruppe A radiologisch als non-union klassifiziert. Bei einem Tier (Nr.12137) konnte während der Operation das Periost am Trans-Kortex nicht vollständig entfernt werden, wodurch bei diesem Schaf der Osteotomiespalt auf der Trans-Seite nach 12 Wochen überbrückt war (delayed-union).

In der Gruppe B stellte sich das autogene Knochenmaterial als größtenteils homogenes, wenig knochendichtes Material dar, welches nicht in allen Fällen den Osteotomiespalt vollständig ausfüllte. Nach 4 und 8 Wochen waren bei allen Tieren radiologische Anzeichen einer fortgeschrittenen Defektheilung zu sehen mit viel periostalem und endostalem Kallus, der teilweise den Osteotomiespalt überbrückte. Wie erwartet, war nach 12 Wochen die Osteotomie bei allen Tieren radiologisch partiell ohne Komplikationen geheilt.

Bei den postoperativ durchgeführten Röntgenaufnahmen in den Gruppen C, D und E war das Hydrogel infolge der Beimischung von Kontrastmittel als sehr röntgendichte homogene Masse im Bereich des Osteotomiespalt es deutlich zu erkennen und reichte

teilweise über den Trans-Kortex hinaus (Abb.5). Bei der Röntgenkontrolle nach einer Woche stellte sich das Hydrogel in Gruppe C und D dann als wenig mineraldichte homogene Masse dar. Bei Gruppe E konnte bei der Kontrolle nach einer Woche das Hydrogel radiologisch nicht mehr dargestellt werden. In den Gruppen C und D waren nach 4 und 8 Wochen radiologisch keine Anzeichen von Defektheilung zu sehen, und um das Hydrogel wurde eine feine röntgendurchlässige Zone beobachtet. Die Hydrogelmatrix erschien bei einigen Tieren im Osteotomiespalt zusammengedrückt und wölbte sich deutlich mehr über den Osteotomiespalt auf der Trans-Seite hervor (Abb.7). Nach 12 Wochen waren diese Befunde noch deutlicher und bei einigen Tieren wurde knöcherner Kallus auf der Cis-Seite gesehen, an der sich in diesen Fällen kein Hydrogel mehr befand (Abb.8). Wohingegen in Gruppe C die Residualmenge des Hydrogels nach 12 Wochen in etwa der Ausgangsmenge entsprach, war es bei den Tieren der Gruppe D deutlich reduziert (Abb.9). Bei allen Tieren außer einem Schaf der Gruppe D, bei dem die Osteotomie partiell geheilt war, wurde die Heilung als non-union klassifiziert.

In der Gruppe E wurde nach 4 Wochen lediglich eine Abrundung der Osteotomieenden beschrieben. Bei 4 Tieren war nach 8 und 12 Wochen nur wenig bis kein endostaler oder periostaler Kallus auf der Cis-Seite zu sehen, und die Heilung der Osteotomie wurde daher radiologisch als delayed-union klassifiziert. Bei 2 Tieren wurde im Verlauf deutlich mehr Kallusbildung und daher nach 12 Wochen eine partielle Heilung beobachtet.

Das bei Gruppe F eingesetzte Hydrogel war postoperativ radiologisch nicht sichtbar (Abb.6). Nach 4 und 8 Wochen waren bei allen Tieren radiologisch Anzeichen einer fortgeschrittenen Defektheilung zu sehen mit viel periostalem und endostalem Kallus, der teilweise den Osteotomiespalt überbrückte. Diese Veränderungen waren vorwiegend auf der Trans-Seite zu sehen. Nach 12 Wochen war die Osteotomie bei allen Tieren radiologisch partiell ohne Komplikationen geheilt (Abb.10).

4.3.1 Statistischer Vergleich der verschiedenen Gruppen

Die genauen Ergebnisse der radiologischen Auswertung können der Tabelle A.1 im Anhang entnommen werden.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der radiologischen Auswertung sind der Tabelle 4.1. zu entnehmen.

Tabelle 4.1: Ergebnisse des Radiologie-Scorings: Mittelwerte und deren Standardabweichungen; Score siehe S. 23

Gruppe	Zeit- raum	Cis- Kortex	Trans- Kortex	Material- rest
A Leerprobe	4 Wochen	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.9	Nicht ausgewertet
	8 Wochen	1.2 ± 1.1	0.5 ± 0.9	
	12 Wochen	2.0 ± 0.9	0.4 ± 0.9	
B Autogene Spongiosa	4 Wochen	0.6 ± 0.9	2.0 ± 0.9	1.1 ± 0.9
	8 Wochen	2.4 ± 0.5	2.3 ± 0.5	1.4 ± 0.8
	12 Wochen	2.7 ± 0.3	2.3 ± 0.6	2.0 ± 0.0
C Fibrinmatrix Kontrastmittel 2µm MBCP PTH	4 Wochen	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.4	0.0 ± 0.0
	8 Wochen	0.4 ± 0.7	0.4 ± 0.8	0.0 ± 0.0
	12 Wochen	2.8 ± 0.2	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4
D Fibrinmatrix Kontrastmittel 10µm TCP PTH	4 Wochen	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0
	8 Wochen	0.7 ± 0.9	0.6 ± 0.8	0.0 ± 0.0
	12 Wochen	1.9 ± 0.2	0.8 ± 1.2	0.0 ± 0.0
E Fibrinmatrix Kontrastmittel PTH	4 Wochen	0.1 ± 0.1	0.6 ± 1.1	Nicht ausgewertet
	8 Wochen	1.3 ± 1.0	0.9 ± 1.2	
	12 Wochen	2.0 ± 0.3	1.0 ± 1.2	
F Fibrinmatrix PTH	4 Wochen	0.0 ± 0.0	1.3 ± 1.0	Nicht ausgewertet
	8 Wochen	0.9 ± 1.0	2.6 ± 0.6	
	12 Wochen	2.6 ± 0.9	2.8 ± 0.3	

Das Knochenwachstum und die Kallusbildung an der Cis- und Trans-Seite zeigte unter Einbeziehung des Zeitraumes ohne Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit eine deutliche Signifikanz ($p = 0.000$ (Cis), $p = 0.008$ (Trans)) bei den multivariaten Analysemethoden, z.B. Pillai's Trace, Roy's Largest Root.

Mit Hilfe des Post Hoc Tests nach Scheffe konnte nachgewiesen werden, dass sich signifikant mehr neuer Knochen und Kallusgewebe an dem Cis-Kortex von Gruppe B als bei Gruppe C ($p = 0.028$) und D ($p = 0.031$) gebildet hatte. An dem Trans-Kortex wies Gruppe F signifikant mehr Knocheneubildung auf als Gruppe C ($p = 0.010$), D ($p = 0.022$) und Gruppe A ($p = 0.023$). Ebenfalls zeigte Gruppe B signifikant mehr Knochenregeneration an dem Trans-Kortex als Gruppe C ($p = 0.036$). Restmengen des jeweils eingesetzten Materials konnten radiologisch ausschließlich bei den Gruppen B, C und D gefunden werden, wobei Gruppe B signifikant weniger erkennen ließ ($p = 0.000$) als die anderen beiden Gruppen.

4.4 Mikroradiographische Auswertung

Im direkten Vergleich zu den Histologien konnte bei allen Dickschnitten eine Übereinstimmung von röntgendichten und histologisch mit Toluidin-Blau gefärbten Knochenstrukturen festgestellt werden. Da Kalziumphosphat Keramiken röntgendicht sind, verhielt sich die residuale Hydrogelmatrix der Gruppen C und D sowohl bei den Histologien als auch bei den Mikroradiographien ähnlich wie Knochengewebe. Bereiche dicht gepackter Granula zeigten sich dabei röntgendichter (dunkelblau in der Histologie) als die in Resorption befindlichen Bereiche (Abb.11a/b). Auf eine gesonderte Evaluation der Mikroradiographien wurde verzichtet.

4.5 Histomorphometrische Auswertung der Dickschnitte

Die genauen Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung können der Tabelle A.2 entnommen werden.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Ergebnisse sind in der Tabelle 4.2. zu finden.

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Histomorphometrie; Mittelwerte und deren Standardabweichung der von der jeweiligen Phase eingenommenen Fläche in Prozent

Gruppe	Implantiertes Material	Alte Knochenmatrix (%)	Neue Knochenmatrix (%)	Fibröses Gewebe (%)	Residuales Hydrogel (%)
A	Leerdeфекt	13,9 ± 4,8	13,7 ± 4,7	73,3 ± 2,7	0,0 ± 0,0
B	Autogene Spongiosa	13,2 ± 6,1	46,9 ± 6,0	40,2 ± 9,8	0,0 ± 0,0
C	Fibrinmatrix, Kontrastmittel, 2µm MBCP, PTH	7,7 ± 3,2	13,9 ± 7,5	35,8 ± 7,4	42,5 ± 13,8
D	Fibrinmatrix, Kontrastmittel, 10µm TCP, PTH	9,6 ± 4,3	26,6 ± 18,5	43,5 ± 10,7	20,7 ± 14,0
E	Fibrinmatrix, Kontrastmittel, PTH	13,1 ± 6,4	24,4 ± 15,3	61,4 ± 14,7	1,1 ± 1,4
F	Fibrinmatrix, PTH	6,7 ± 3,0	43,8 ± 13,7	49,5 ± 11,7	0,0 ± 0,0

4.5.1 Statistischer Vergleich der verschiedenen Gruppen

Den geringsten Anteil alter Knochenmatrix wies Gruppe F auf, wobei sich der Unterschied zu den anderen Gruppen als nicht signifikant herausstellte.

Die größte Menge neugebildeten Knochens konnte bei Gruppe B beobachtet werden (Abb.4.1). Es wurde bei ihr mit deutlicher Signifikanz mehr neuer Knochen gebildet, als

bei Gruppe A ($p = 0.008$) und Gruppe C ($p = 0.008$). Einen vergleichbar hohen Anteil an Knochenneubildung zeigte Gruppe F. Auch hier konnten signifikante Unterschiede zu Gruppe A ($p = 0.012$) und C ($p = 0.012$) festgestellt werden.

Der größte Anteil fibrösen Gewebes konnte bei Gruppe A nachgewiesen werden. Eine statistische Signifikanz lag dabei im Vergleich zu Gruppe B ($p = 0.001$), C ($p = 0.000$), D ($p = 0.020$) und Gruppe F ($p = 0.019$) vor. Am wenigsten fibröses Gewebe zeigte sich bei Gruppe C. Dabei lag sowohl im Vergleich mit Gruppe A ($p = 0.000$) als auch mit Gruppe E ($p = 0.010$) ein deutlich signifikanter Unterschied vor.

Von den vier Gruppen mit Hydrogel hatte Gruppe C den größten residualen Anteil an eingesetztem Material. Bei der Gegenüberstellung dieser Gruppen konnte ein deutlich signifikanter Unterschied beobachtet werden. Während bei Gruppe E ($p = 0.017$) und F ($p = 0.010$) nahezu das ganze Material abgebaut war, betrug der Gelanteil bei Gruppe D 20,7%. Mit diesem residualen Anteil lag D ($p = 0.04$) jedoch signifikant niedriger als Gruppe C mit einem Anteil von 42,5%.

Bei der Auswertung der Korrelationen zeigte sich, dass die neugebildete Knochenmatrix negativ mit der Menge an fibrösem Gewebe ($r = -0.480$, $p = 0.004$) und ebenfalls negativ mit der Menge an residualer Hydrogelmatrix ($r = -0.472$, $p = 0.004$) korrelierte. Ebenso bestand zwischen dem auftretenden fibrösen Gewebe und der residualen Hydrogelmenge ($r = -0.507$, $p = 0.002$) eine negative Korrelation.

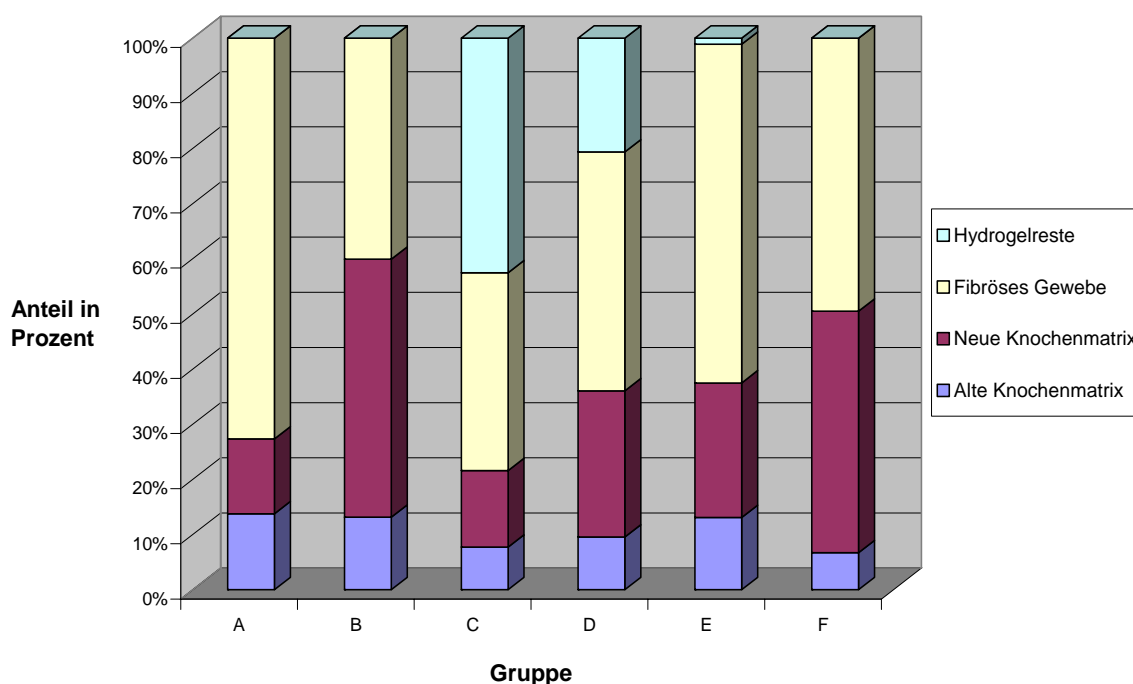


Abb. 4.1: Prozentuale Gewebezusammensetzung im Defektbereich bei den verschiedenen Gruppen auf Grundlage der jeweiligen Mittelwerte

4.6 Histologisch-morphologische und histologisch-zelluläre Auswertung anhand der Dick- und Dünnschnitte

Die genauen Daten der semiquantitativen histologischen Auswertung können der Tabelle A.3-7 entnommen werden.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertungen sind in der Tabelle 4.3 zu finden.

Tabelle 4.3: Ergebnisse der histologischen Auswertung mittels Scoresystem; Mittelwerte und deren Standardabweichungen; Score siehe Seite 25

Zellart	Lokalisation	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E	Gruppe F
Mono-nukleäre Zellen	Cis	1.2 ± 0.8	1.0 ± 1.0	0.9 ± 1.0	1.8 ± 0.4	1.3 ± 0.8	1.3 ± 0.5
	Trans	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.7	2.3 ± 0.5	2.3 ± 0.8	1.5 ± 0.8	0.8 ± 0.8
	Cis+Tans	2.0 ± 0.9	2.0 ± 1.6	3.2 ± 0.8	4.2 ± 1.2	2.8 ± 1.2	2.2 ± 0.9
	Defekt	2.7 ± 0.8	2.2 ± 0.8	5.2 ± 1.6	4.2 ± 1.9	3.0 ± 1.1	2.5 ± 1.0
	Gesamt	4.7 ± 1.2	4.2 ± 2.0	8.3 ± 2.3	8.3 ± 1.6	5.8 ± 1.9	4.7 ± 1.6
Makrophagen	Cis	1.2 ± 0.8	0.8 ± 0.8	2.5 ± 1.9	2.3 ± 0.5	0.8 ± 0.8	0.7 ± 0.8
	Trans	0.7 ± 0.8	0.8 ± 0.4	3.5 ± 1.4	2.7 ± 1.0	0.8 ± 1.0	0.3 ± 0.8
	Cis+Tans	1.8 ± 1.5	1.6 ± 1.1	6.0 ± 2.7	5.0 ± 1.4	1.7 ± 1.2	1.0 ± 1.5
	Defekt	2.0 ± 1.1	2.4 ± 0.5	5.8 ± 1.3	3.7 ± 2.0	2.7 ± 0.5	1.8 ± 1.0
	Gesamt	3.8 ± 2.5	4.0 ± 1.4	11.8 ± 2.9	8.7 ± 1.8	4.3 ± 1.5	2.8 ± 2.0
Mehr-kernige Riesen-zellen	Cis	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.7 ± 2.0	0.5 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0
	Trans	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.5 ± 1.4	0.5 ± 1.2	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0
	Cis+Tans	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	4.2 ± 2.7	1.0 ± 1.5	0.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0
	Defekt	0.3 ± 0.8	0.4 ± 0.5	6.3 ± 2.1	1.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Gesamt	0.5 ± 0.8	0.4 ± 0.5	10.5 ± 4.3	2.3 ± 2.1	0.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0
Osteo-klasten	Cis	1.5 ± 0.5	1.8 ± 0.4	2.3 ± 0.8	2.2 ± 0.8	2.0 ± 0.6	1.5 ± 0.5
	Trans	1.5 ± 0.5	0.6 ± 0.5	2.5 ± 1.0	1.5 ± 1.4	2.7 ± 1.8	2.0 ± 1.3
	Cis+Tans	3.0 ± 0.9	2.4 ± 0.9	4.8 ± 1.2	3.7 ± 1.4	4.7 ± 1.8	3.5 ± 1.6
	Defekt	0.8 ± 1.0	0.8 ± 1.3	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.8	0.7 ± 0.8	2.2 ± 0.8
	Gesamt	3.9 ± 1.5	3.2 ± 1.9	5.3 ± 1.2	4.0 ± 1.7	5.3 ± 1.2	5.7 ± 2.3
Fibro-zyten	Cis	1.7 ± 1.6	0.0 ± 0.0	1.2 ± 1.6	0.8 ± 1.0	0.8 ± 0.8	1.5 ± 1.5
	Trans	3.3 ± 1.9	0.4 ± 0.5	4.2 ± 0.8	3.5 ± 1.5	2.2 ± 1.0	0.5 ± 0.8
	Cis+Tans	5.0 ± 3.0	0.4 ± 0.5	5.3 ± 2.1	4.3 ± 2.2	3.0 ± 1.4	2.0 ± 1.7
	Defekt	6.7 ± 3.2	1.4 ± 1.7	5.5 ± 1.0	5.2 ± 3.6	7.0 ± 2.5	2.2 ± 2.0
	Gesamt	11.7 ± 5.7	1.8 ± 1.6	10.8 ± 2.7	9.5 ± 5.2	10.0 ± 3.2	4.2 ± 3.7

4.6.1 Gruppe A (Leerprobe)

Bei dieser Gruppe zeigte sich in geringem Maße periostale Kallusbildung an der Cis-Seite. Im Bereich der Osteotomieenden kam es bei allen Tieren zu geringgradiger Bildung neuen Knochengewebes. An dem Cis-Kortex konnten Knochentrabekel mit aktivierten Osteoblasten und Bildung von Geflechtknochen nachgewiesen werden, wohingegen der plattenferne Kortex wenig osteogenetische Reaktionen aufwies. Bei keinem Tier dieser Gruppe konnte enchondrale Ossifikation beobachtet werden. Als vorherrschendes Gewebe im Bereich des Osteotomiespaltes zeigte sich lockeres, fibröses Bindegewebe (Abb.12) mit einer mittelmäßigen Anzahl diffus einsprossender Gefäße, was auf zellulärer Ebene durch Endothelzellen und deutlich vermehrtes Auftreten von Fibroblasten und Fibrozyten zu erkennen war. Dies wurde auch mit deutlicher Signifikanz ($p = 0.017$) durch die insgesamt hohe Anzahl an Bindegewebszellen im Vergleich zu Gruppe B untermauert. Ein normales histologisches Bild einer Knochenheilung eines „critical size defects“ präsentierte sich. Vereinzelt konnten Entzündungszellen wie z.B. lymphozytäre Zellen, Plasmazellen, neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen nachgewiesen werden. Mehrkernige Riesenzellen konnten nicht festgestellt werden. Auch Osteoklasten zeigten sich nur in gemäßigter Anzahl, sie konzentrierten sich auf die Bereiche des Knochenumbaus (Remodeling) an den Osteotomieenden.

4.6.2 Gruppe B (autogener Knochenersatz)

Beide Kortizes dieser Gruppe wiesen deutliches periostales Kallusgewebe auf. Bei allen Tieren kam es zu einer histologisch sichtbaren Überbrückung des Osteotomiespaltes (bridging) mit partiellem Verschluss der Markhöhle. Eine hohe Anzahl enchondraler Ossifikationen konnte beobachtet werden. Sie lagen in Form zahlreicher multifokaler Areale mit hypertrophierten Knorpelzellen und beginnender Mineralisation vor. Das Spektrum der vorgefundenen Zelltypen wurde von aktiven Osteoblasten, deren Vorläuferzellen und mesenchymalen Stammzellen dominiert. Lymphozytäre Zellen und Makrophagen traten nur vereinzelt, Osteoklasten in physiologischer Anzahl in Bereichen mit erhöhtem Knochenumbau auf. Mehrkernige Riesenzellen konnten in den ausgewählten Bereichen nicht beobachtet werden.

Bei der statistischen Auswertung zeigten sich im Bereich des Defekts signifikant weniger mononukleäre Zellen als bei Gruppe C ($p = 0.034$). Ebenso war die Gesamtzahl

dieser Zellen im Vergleich zu Gruppe C ($p = 0.033$) und D ($p = 0.033$) signifikant geringer. Bindegewebszellen kamen im Bereich des Trans-Kortex signifikant weniger vor als bei Gruppe A ($p = 0.018$), C ($p = 0.001$) und Gruppe D ($p = 0.010$). Beim Vergleich der Osteotomieenden (Cis und Trans) konnten signifikant weniger Bindegewebszellen als bei Gruppe A ($p = 0.031$) und C ($p = 0.017$) nachgewiesen werden. Im Bereich des Defekts wurde dies im Vergleich mit Gruppe E ($p = 0.042$) beobachtet.

4.6.3 Gruppe C (Fibrinmatrix, Kontrastmittel, 2 μ m MBCP, PTH)

Geringgradige peri- und endostale Kallusbildung zeigte sich bei dieser Gruppe fast ausschließlich an der Cis-Seite. Auffallend war eine große Menge an nicht resorbierter Hydrogelmatrix in der Mitte des Defekts vor allem im Bereich der Markhöhle und des Trans-Kortex (Abb.11a/b). Es stellte sich als eine kompakte, zusammenhängende Masse dar ohne Zellen und Gefäßeinsprossung. Um diese residuale Gelmatrix herum hatte sich eine Reaktionszone mit aktiver Resorption gebildet (Abb.13). Es lag keine direkte Verbindung zwischen dem Hydrogel und neugebildetem Knochengewebe vor. Das Zellbild in diesem Bereich wurde von Zellen des Mononukleären Phagozytensystems (Monozyten, Makrophagen, mehrkernige Riesenzellen vom Fremdkörpertyp) sowie lymphozytären Zellen, Plasmazellen (Abb.14), Fibroblasten und Endothelzellen dominiert. Hervorzuheben sind hierbei die mehrkernigen Riesenzellen vom Fremdkörpertyp (Abb.15/16), die in hohem Maße in allen statistisch ausgewerteten Bereichen mit deutlicher Signifikanz vorkamen. Das Gewebe um die Reaktionszone war kapillar- und fibroblastenreich, mit gering- bis mittelgradiger Ausbildung von ungeordneten Bindegewebsfasern. Diese Gewebefasern reichten im Bereich des Trans-Kortex bei fast allen Tieren bis an die Osteotomieenden, an denen sie zum größten Teil dem Osteoid direkt auflagen. Ein aktiver Osteoblastensaum fehlte und die Bildung neuen Knochengewebes blieb aus. Bei einem Schaf (Nr. 12143) konnte eine Osteolyse beobachtet werden (Abb.17).

Im Gegensatz zum Trans-Kortex zeigte der Cis-Kortex deutlichere osteogenetische Reaktionen, Osteoblasten waren in größerer Anzahl vorhanden und es kam zur Bildung neuen Geflechtknochens. Bei der Hälfte der Tiere dieser Gruppe kam es an dem Cis-Kortex zur Überbrückung des Osteotomiespaltes. Mit Ausnahme eines Tieres (Nr.12139) konnte bei den restlichen enchondrale Ossifikation in diesem Bereich gefunden werden.

Die statistische Auswertung ließ eine signifikant höhere Anzahl an mononukleären Zellen in der Umgebung des Trans-Kortex als bei Gruppe A ($p = 0.034$) und F ($p = 0.034$) erkennen. Wie schon in 4.6.2 erwähnt, war die Zahl an mononukleären Zellen sowohl innerhalb des Defekts als auch insgesamt signifikant höher als bei der positiven Kontrollgruppe. Außer an der Cis-Seite traten an allen statistisch ausgewerteten Bereichen in signifikant hohem Maße mehr Makrophagen auf als bei den Gruppen A, B, E, und F ($p_{\min} 0.000$ bis $p_{\max} 0.007$). Im Vergleich zur Gruppe B wurden signifikant mehr Bindegewebszellen ($p = 0.036$) gefunden.

4.6.4 Gruppe D (Fibrinmatrix, Kontrastmittel, 10 μ m TCP, PTH)

Bei dieser Gruppe bildete sich nur geringgradiger periostaler Kallus fast ausschließlich an der Cis-Seite. Hier war eine deutlich ausgeprägte Knochenneubildung zu erkennen, die teilweise bis in die Markhöhle hineinreichte. Ebenso wie bei Gruppe C zeigte sich deutlich weniger Knochen auf der Trans-Seite. Eine komplette Überbrückung des Osteotomiedefekts war histologisch ausschließlich bei einem Tier (Nr.12168) auf der Cis-Seite zu beobachten, enchondrale Ossifikation hingegen wurde bei allen Tieren festgestellt. Insgesamt wurde weniger residuales Hydrogel und mehr Knochenneubildung als bei der vorherigen Gruppe beobachtet. Aber auch bei dieser Gruppe kam es zu keiner direkten Verbindung zwischen neuem Knochen und Hydrogelmatrix. Das histologische Bild ähnelte sehr dem von Gruppe C, wohingegen hauptsächlich Makrophagen und nur wenige mehrkernige Riesenzellen nachgewiesen werden konnten (Abb.18/19). Bei größerem Abstand zur Reaktionszone konnten vermehrt auch zellärmere Bereiche mit ausgeprägter Kollagenfaserbildung beobachtet werden. Bei dieser Gruppe wurde wie bei Gruppe C eine signifikant höhere Anzahl an lymphozytären Zellen im Bereich der Trans-Kortex als bei Gruppe A und F festgestellt. Makrophagen traten mit unterschiedlicher Signifikanz an verschiedenen Bereichen vermehrt auf:

Trans-Kortex: im Vergleich zu Gruppe A ($p = 0.049$) und F ($p = 0.014$)

Fragment: im Vergleich zu Gruppe F ($p = 0.015$)

Gesamt: im Vergleich zu Gruppe A ($p = 0.022$), B($p = 0.042$) und F ($p = 0.003$)

4.6.5 Gruppe E (Fibrinmatrix, Kontrastmittel, PTH)

Bei dieser Gruppe konnte vor allem auf der Cis-Seite mittelgradige periostale Kallusbildung beobachtet werden. Eine Ausnahme machte dabei ein Schaf (Nr. 12203), bei dem sich deutlich Kallusgewebe an der Trans-Seite gebildet hatte und der komplette Osteotomiespalt einschließlich der Markhöhle mit neugebildetem Geflechtknochen überbrückt war. Ähnlich wie bei den Gruppen C und D überwog die Knochenneubildung an dem Cis-Kortex der an dem Trans-Kortex. Es kam bei einigen Tieren zu partiellem Einwachsen neugebildeten Knochens in die Markhöhle. Im histologischen Dickschnitt färbte sich residuale Hydrogelmatrix blau an, wohingegen mikroradiographisch aufgrund der fehlenden Kalziumphosphat Granula kein residuales Hydrogel zu erkennen war. Das Zellbild erschien unauffällig. Mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten), Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen traten in geringer Anzahl diffus verteilt auf. Bei allen Tieren dieser Gruppe trat besonders an dem Trans-Kortex und im Defektbereich eine hohe Anzahl an Fibroblasten und Fibrozyten auf. Innerhalb des Defektbereiches zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl im Vergleich zu Gruppe B ($p = 0.042$).

4.6.6 Gruppe F (Fibrinmatrix, PTH)

Das periostale Kallusgewebe war besonders an der Trans-Seite stark ausgebildet. Bei allen Tieren konnte eine ausgeprägte Knochenregeneration an beiden Kortizes beobachtet werden. Mit Ausnahme von einem Tier (Nr. 12110) wurde der Osteotomiespalt bei allen Schafen mindestens an der Trans-Seite überbrückt (komplettes „Bridging“ bei 2 Tieren). Auch die Markhöhle war mit neuem Knochen durchwachsen. Vereinzelt waren geringe Mengen an residualem Hydrogelmateriale in direkter Verbindung mit neugebildetem Knochen zu beobachten. Enchondrale Ossifikationen traten ausgeprägt und an mehreren Stellen auf (Abb.20). Auf zellulärer Ebene zeigten sich diffus verteilt einzelne lymphozytäre Zellen, Plasmazellen und Makrophagen. Mehrkernige Riesenzellen wurden in den ausgewerteten Bereichen nicht nachgewiesen. Das Zellbild ähnelte dem von Gruppe B und wurde ebenfalls von aktiven Osteoblasten dominiert. Sie waren durch ihre runde, hypertrophische Form zu erkennen und lagen palisadenartig angeordnet auf der Oberfläche von neugebildetem Osteoid. Im Osteoid und dem darunterliegenden Geflechtknochen befanden sich regelmäßig verteilte Osteozyten, die in physiologisch geringerer Anzahl als die Osteoblasten

vorkamen (Abb.21). Osteoklasten konnten regelmäßig und vermehrt nachgewiesen werden und konzentrierten sich auf die Bereiche des Knochenumbaus. Statistisch zeigte sich dies, durch die im Vergleich zu Gruppe D signifikant höhere Anzahl an Osteoklasten im Defektbereich ($p = 0.047$). Die Gesamtzahl an gefundenen Osteoklasten war höher als bei allen anderen Gruppen, es lag jedoch keine Signifikanz vor.

5 Diskussion

5.1 Ziel der Studie

In der vorliegenden Studie sollte anhand eines segmentalen „critical size defects“ an der Tibia von Schafen, die Eignung vier unterschiedlich strukturierter, auf einem Fibringerüst basierender Hydrogele als Knochenersatzstoffe untersucht und ein Vergleich mit Positiv- und Negativkontrollgruppen durchgeführt werden. Beide Kontrollgruppen zeigten die zu erwartenden Resultate. Die Leerdefekte der Negativkontrollgruppe heilten entsprechend eines „critical size defects“ hauptsächlich durch Bindegewebsbildung und nur in geringem Maße durch Regeneration des Knochengewebes⁸². Die positive Kontrollgruppe, mit autologer Spongiosa gefüllt, erwies sich, wie bereits in vielen Studien zuvor berichtet, als osteoinduktiv, osteokonduktiv und osteogenetisch^{4,5,8,83}. Mit der autologen Spongiosa vergleichbare Resultate lieferte das Hydrogel der Gruppe F mit offener Porenstruktur und geringer struktureller Beschaffenheit. Ein hohes Maß an knöcherner Regeneration und Biokompatibilität sowie eine deutlich ausgeprägte Fähigkeit zur Osteointegration und Osteoinduktion konnten beim Einsatz dieser Gelmatrix beobachtet werden.

Die Resultate der drei Hydrogele mit dichter Porenstruktur (Gruppen C, D und E) und zusätzlich hoher struktureller Beschaffenheit (Gruppen C und D) unterschieden sich deutlich von denen der positiven Kontrollgruppe sowie der Gruppe F. Dabei lieferte Gruppe E mit dichter Porenstruktur ohne Zusatz von Kalziumphosphat-Granula mit der Negativkontrollgruppe vergleichbare Werte. Die Komposites der Gruppen C und D zeigten ein verzögertes Abbauverhalten der Hydrogelmatrix mit verminderter Biokompatibilität und nur geringgradiger knöcherner Regeneration, vor allem an dem Trans-Kortex. Deutliche zelluläre Reaktionen des umliegenden Gewebes konnten beobachtet werden, die als eine Fremdkörperreaktion in Form einer granulomatösen Entzündung anzusprechen sind. In der vorliegenden Studie stellte sich die dichte Porenstruktur der eingesetzten Hydrogele als ungeeignet für die Rekonstruktion großer segmentaler Knochendefekte an der Tibia von Schafen heraus, wohingegen die offene Porenstruktur gute Resultate erzielte.

5.2 Die Wahl eines geeigneten Versuchsmodells

Zur Evaluation der klinischen Eignung eines Knochenersatzmaterials spielen Studien an Knochendefektmodellen eine wichtige Rolle. Hierbei ist besonders auf vier Kriterien zu achten: Die Wahl der Spezies, das Alter der verwendeten Tiere sowie die Größe und die Lage des gesetzten Defekts.

Das Schaf als phylogenetisch hochstehendes Tier mit seiner Fähigkeit zur primären Knochenheilung und seinem ausgeprägten Haverschen System hat sich als geeignetes Versuchstier erwiesen. Seine Knochenstruktur und Remodellierungsrate ist mit der des Menschen gut vergleichbar^{31,84-86}.

Da juvenile Tiere genau wie Kinder⁸⁷ ein höheres osteogenetisches Potential besitzen, sollten in einer Knochenheilungsstudie ausschließlich adulte Tiere verwendet werden. Unverhältnismäßig gute Ergebnisse können dadurch vermieden werden^{82,86}.

Da die Heilungsrate eines Knochendefekts wesentlich von seiner Größe abhängt⁸⁸, sollte der gesetzte Defekt für Knochenheilungsstudien so groß gewählt werden, dass eine Spontanheilung ausgeschlossen werden kann. Dies ist bei einem „critical size defect“ der Fall. Hierbei handelt es sich der Definition nach um einen Defekt, der innerhalb eines Jahres weniger als 10% knöcherne Regeneration aufweist⁸² und dessen Heilung sich durch Bindegewebsbildung und nicht durch neugebildeten Knochen auszeichnet⁸².

Ein weiteres zu berücksichtigendes Kriterium ist die Lage des Defekts. So liefert z.B. ein in Form einer parietalen Kraniotomie gesetzter Defekt andere Heilungsvoraussetzungen als ein an einer Extremität gesetzter segmentaler „critical size defect“⁸⁶. Beide Modelle stellen unterschiedliche Anforderungen an ein Knochenersatzmaterial. Bei einem parietalen Kraniotomiemodell liegt eine mechanisch stabile Umgebung vor⁸², das knöcherne Regenerationsvermögen ist sehr gering und der Heilungsprozess läuft ausschließlich in Form von desmaler Ossifikation ab⁸⁹. Im Gegensatz dazu ist ein an einer Extremität gesetzter Defekt stärkeren mechanischen Belastungen ausgesetzt, besitzt ein höheres Regenerationsvermögen als die Knochen des Kopfes und heilt sowohl durch enchondrale als auch desmale Ossifikation. Bei der Entwicklung von Knochenersatzmaterialien ist somit von entscheidender Bedeutung, dass die chemische Zusammensetzung sowie die physikalischen und mechanischen Eigenschaften eines Knochenersatzstoffes dem jeweiligen Implantationsort angepasst sind. So benötigt ein als Stütze eines Wirbelkörpers eingesetztes Ersatzmaterial eine

wesentlich höhere strukturelle Beschaffenheit als ein in der mechanisch stabilen Umgebung eines Schädelknochens eingesetztes Material.

Das in der vorliegenden Studie an adulten, weiblichen Schafen durchgeführte Tibiadefektmodell hat sich bereits bei vorherigen Versuchen als geeigneter Test für Kompositen unterschiedlicher Struktur und Zusammensetzung erwiesen. Es liefert die Möglichkeit, das eingesetzte Material auf Biokompatibilität, Abbaurate, Osteointegration und seine Handhabung in einem zwar lasttragenden, aber dennoch durch Osteosynthese-Platte gestützten Gebiet zu testen. Der Vorteil besteht darin, sowohl gering als auch stark strukturiertes Knochenersatzmaterial in einem mechanisch belasteten Gebiet einsetzen und miteinander vergleichen zu können. Eine Vorselektion für andere Indikationszwecke wie z.B. der Einsatz in einer Vertebroplastie wird dadurch ermöglicht.

5.3 Operation und postoperative Phase

Bei 34 Tieren verlief die Operation komplikationslos. Bei einem Tier brach beim Anfertigen des siebten, defektnahen Schraubenloches die Spitze des Bohrers ab. Sie wurde im Bohrkanal belassen und eine kürzere Kortikalisschraube eingesetzt. Es konnten keine negativen Auswirkungen auf das Tier und die Resultate festgestellt werden.

Der mediale Zugang zur Tibiadiaphyse konnte aufgrund des „Planum cutaneum“ in diesem Bereich ohne aufwendige Präparation durchgeführt, die LC-DC-Platte angepasst und der standardisierte Defekt gesetzt werden. Alle vier Hydrogele erwiesen sich in der Handhabung als benutzerfreundlich. Sie wurden mit Hilfe einer Spritze retrograd in den Osteotomiespalt appliziert und füllten ihn vollständig aus. Dadurch konnte ein direkter Kontakt zu den knöchernen Defektgrenzen erreicht werden. Das Hydrogel der Gruppen C, D und E härtete sehr schnell zu einer festen, weißen, silikonähnlichen Masse aus, wohingegen es bei Gruppe F eine elastischere, gelartige Struktur erhielt. Um genügend Material zum Auffüllen des Defekts bei der positiven Kontrollgruppe zu erhalten, musste eine große Menge autogener Knochenspongiosa aus dem gegenüberliegenden Beckenkamm entnommen werden. Bei den Tieren dieser Gruppe konnte über mehrere Wochen vermehrtes Liegen festgestellt werden, was auf eine Schmerzreaktion hindeutete.

Bei keinem der Tiere kam es zu einem Implantatversagen der Osteosynthese-Platte. Der Einsatz der LC-DC-Platte in Verbindung mit dem Hängesystem und den Castverbänden

erwies sich mit einer 100%igen Erfolgsrate als sehr effektive Methode zur Vermeidung von Komplikationen.

5.4 Radiologische Auswertung

Mit den postoperativen Röntgenaufnahmen konnte die Lage der Osteotomieenden und die Position der Platte kontrolliert und der Operationserfolg überprüft und bestätigt werden. Bei den Gruppen C, D und E bestand aufgrund des röntgendichten Kontrastmittels ebenfalls die Möglichkeit, die Positionierung und Ausdehnung des Hydrogels zu beurteilen, während die bei Gruppe F eingesetzte Gelmatrix radiologisch nicht sichtbar war. Das eingesetzte Kontrastmittel wurde innerhalb weniger Tage vollständig resorbiert und war nach einer Woche radiologisch nicht mehr feststellbar. Infolgedessen konnte ausschließlich die Gelmatrix der Gruppen C und D aufgrund der röntgendichten Struktur der beigemischten Kalziumphosphat-Granula während des gesamten Versuchszeitraumes als wenig mineraldichte, homogene Masse im Defektbereich nachgewiesen werden.

Die Röntgenaufnahmen nach 1, 4 und 8 Wochen wurden ohne Abnahme des Castverbandes angefertigt, um die Stabilität der Osteotomie nicht zu gefährden. Das polymere Material des Verbandes führte zu einer geringgradigen Verschattung der Röntgenbilder, was ihre Auswertung aber nicht beeinträchtigte.

Nach 12 Wochen wurde post mortem die Tibia von dem umliegenden Weichteilgewebe befreit, die LC-DC-Platte entfernt und mit Hilfe einer Makroradiographie die Heilungstendenz der Osteotomie beurteilt. Bei den Gruppen A, C und D wurde sie als non-union, bei der Gruppe E als delayed union, bei den Gruppen B und F als partiell geheilt klassifiziert.

Positiv hervorzuheben ist die deutliche Kallus- und Knochenneubildung an dem Trans-Kortex bei Verwendung des Hydrogels mit offener Porenstruktur (Gruppe F). Nach zwölf Wochen wurde in diesem Bereich sogar mehr neuer Knochen als bei der positiven Kontrollgruppe festgestellt. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der Operationsmethode zu finden sein. Diese zeichnete sich im Wesentlichen durch retrograde Injektion des viskösen Gels von medial mit anschließendem Anbringen der LC-DC-Platte in Seitenlage des Schafes aus. Das Hydrogel könnte sich dadurch, vor allem im Bereich des lateralen, plattenfernen Trans-Kortex angesammelt und die Knochenheilung durch seine osteoinduktive Wirkung gefördert haben. Da der radiologische Nachweis der Gelmatrix von Gruppe F ohne Kontrastmittel jedoch nicht

möglich war, konnte kein direkter Beweis dieser Hypothese erbracht werden. Eine indirekte Bestätigung erfolgte jedoch mit Hilfe der röntgendichten Komposites der Gruppen C und D, bei denen das Gel radiologisch besonders im Bereich des Trans-Kortex und über die knöcherne Grenze hinaus nachgewiesen wurde. Die positiven Resultate von Gruppe F in diesem Gebiet konnten bei den Gruppen C und D allerdings nicht festgestellt werden. Im Verlauf der Studie wurde eine deutlich verminderte Knochenneubildung mit teilweiser osteolytischer Tendenz festgestellt, die darauf schließen lässt, dass das residuale Hydrogel dieser Gruppen die Heilung behinderte. Bereits nach 4 Wochen wurde das im Bereich des Trans-Kortex und des Knochenmarks als kompakte Masse abgelagerte Hydrogel von einer feinen röntgendurchlässigen Zone umgeben. In der histologischen Untersuchung stellte sich dieser Bezirk als Reaktionszone mit deutlich vermehrtem Auftreten von Entzündungszellen, beladenen Makrophagen und Riesenzellen sowie vermehrter Bindegewebsbildung heraus. Die Biokompatibilität und die Osteokonduktivität dieser beiden Hydrogele mit dichter Porenstruktur mussten deshalb bereits aufgrund der radiologischen Untersuchungen in Frage gestellt werden.

5.5 Makroskopische Auswertung

Die makroskopische Auswertung bestätigte die bereits bei der radiologischen Untersuchung beurteilte Heilungstendenz der Osteotomien. Sowohl bei dem Einsatz autologer Spongiosa als auch bei dem Hydrogel mit offener Porenstruktur (Gruppe F) war der Defektbereich nach Abnahme der Osteosyntheseplatte bei manuell ausgeübten Druck- und Biegebewegungen stabil und gut mit neuem Knochen durchbaut. Im Gegensatz dazu wiesen die Osteotomien der Leerdefekte und der überwiegende Teil der Proben mit dicht strukturiertem Hydrogel keine Stabilität auf und wurden hauptsächlich bindegewebig zusammengehalten.

Besonders bei Gruppe C im Bereich des Trans-Kortex auftretendes residuales Hydrogel war von einer fibrösen Bindegewebsschicht überzogen. Die Beurteilung des Defektbereiches ergab bei keiner der Gruppen makroskopisch sichtbare Merkmale einer akuten Entzündung wie z.B. Rötung und Nekrosen.

5.6 Probengewinnung und -aufbereitung

Das den Defekt enthaltende Knochenstück konnte bei allen Tieren mit Hilfe einer Bandsäge unversehrt gewonnen werden. Die Aufbereitung der Proben für die Histologie

ist für unser Labor eine standardisierte Methode, die normalerweise keine Probleme bereitet. Eine Herausforderung bestand jedoch im Schneiden der Proben auf Höhe des maximalen Diaphysendurchmessers mit gleichzeitigem Treffen beider benachbarten Schraubenlöcher. Da sich die Schrauben teilweise in unterschiedlichen Ebenen befanden, konnte in einigen Proben nur eine Schraube abgebildet werden. Die Auswertung der Schnitte wurde dadurch jedoch nicht beeinträchtigt.

5.7 Histologische Auswertung

Mit Hilfe der Histomorphometrie konnte der prozentuale Anteil der für die Studie relevanten Gewebearten in einem standardisierten Bereich des Defekts ermittelt und infolgedessen Rückschlüsse auf die osteogenetischen Fähigkeiten der eingesetzten Komposites gemacht werden. Zur Einschätzung der Biokompatibilität eines implantierten Materials werden als Selektionskriterien sowohl die Bildung einer bindegewebigen Kapsel als auch die zellulären Reaktionen des umliegenden Gewebes herangezogen⁹⁰. Die histologisch-zelluläre Auswertung in Verbindung mit der semiquantitativen Analyse lieferten die zur Einschätzung der Biokompatibilität erforderlichen Resultate.

Wie erwartet konnten bei keiner der 6 Gruppen signifikante Unterschiede im prozentualen Anteil an alter Knochenmatrix festgestellt werden. Auffällig weniger altes Knochengewebe als bei den übrigen Gruppen wurde jedoch bei dem Hydrogel mit offener Porenstruktur (Gruppe F) nachgewiesen. Die Ursache dafür kann bei dieser Gruppe in der besonders hohen Remodellierungsrate des Defekts liegen. Ein großer Teil der Osteotomieenden befand sich nach 12 Wochen in einem deutlichen Umbauprozess und stellte sich dementsprechend durch die veränderte strukturelle Beschaffenheit des Knochens im Toluidinblau gefärbten Dickschnitt dunkelblau dar und wurde daher als neue Matrix detektiert.

Während bei Gruppe C mit 13,9% und der negativen Kontrollgruppe mit 13,7% eine sehr geringe Menge neuer Knochenmatrix gebildet wurde, kam Gruppe F mit 43,8% neugebildetem Knochen der positiven Kontrollgruppe (46,9%) am nächsten und lieferte damit im Vergleich zu den anderen Hydrogelgruppen herausragende Ergebnisse. Mittlere Werte an neuer Knochenmatrix wurden bei den Gruppen D (26,6%) und E (24,4%) gemessen.

Im Verlauf der physiologischen Knochenheilung bildet sich im Bereich der Extremitäten sowohl durch enchondrale als auch durch desmale Ossifikation

Geflechtknochen, dessen unregelmäßig angeordnete Trabekel die Osteotomieenden verbinden und zunächst die Markhöhle verschließen. Zur Wiederherstellung der mechanischen Stabilität des Knochens sind jedoch der Umbau des Geflechtknochens und sein kontinuierlicher Ersatz durch Lamellenknochen sowie die Wiederherstellung der Markhöhle zwingend erforderlich.

Der ausgeprägte Knochenheilungsprozess bei Gruppe F zeigte sich auf zellulärer Ebene durch viele Areale mit enchondraler Ossifikation und einem hohen Anteil an aktivierten, palisadenartig angeordneten Osteoblasten zur Bildung neuen Osteoids. Ein signifikant erhöhtes Auftreten von Osteoklasten im Defektbereich deutete auf einen ausgedehnten Remodellierungsprozess in diesem Bereich zur Wiederherstellung der Markhöhle.

Histomorphometrisch war kein residuales Hydrogel nachweisbar. Lediglich im histologischen Dünnschnitt konnte vereinzelt residuale Hydrogelmatrix zwischen neu gebildeten Knochen trabekeln gefunden werden. Diese direkte Verbindung zwischen Hydrogel und neugebildetem Knochen und die zuvor genannten Beobachtungen ließen auf osteoinduktive und osteokonduktive Fähigkeiten dieses Hydrogels schließen. Eine gute Biokompatibilität bewies das Hydrogel durch ein der physiologischen Knochenheilung entsprechendes Zellbild sowie durch das Fehlen einer bindegewebigen Kapsel um das eingesetzte Material. Das Zellbild der physiologischen Knochenheilung besteht aus einer geringen Anzahl an lymphozytären Zellen, Plasmazellen, Makrophagen und einsprossenden Gefäße, die alle an der Resorption von Biomaterialien aktiv beteiligt sind^{91,92}.

Die bei der Histomorphometrie als fibröses Gewebe detektierte Fläche setzte sich aus mesenchymalem und vaskulärem Gewebe einschließlich des Knochenmarks und Zonen aktiver Hydrogelresorption zusammen. Bei den Gruppen C und D stellte sich eine negative Korrelation zwischen der als fibröses Gewebe und der als residuale Hydrogelmatrix detektierten Fläche heraus. Bei Gruppe E wurde ein hoher Anteil an fibrösem Gewebe und nur noch in geringem Maße residuales Hydrogel (1,1%) gemessen. Die größte Menge an residualem Hydrogel wiesen Gruppe C (42,5%) und D (20,7%) auf. Durch die dichte Struktur der Komposites dieser beiden Gruppen wurde die Markhöhle zu einem großen Teil verschlossen, mesenchymales und vaskuläres Gewebe aus dem Defektbereich verdrängt und sowohl das Einwandern von Zellen als auch das Einwachsen von Gefäßen in die Hydrogelmatrix verhindert. Ein Abbau des Hydrogels war deshalb ausschließlich in zentripetaler Richtung möglich. Das

vorherrschende Zellbild im Bereich der Resorptionszone bestand aus einer deutlich erhöhten Anzahl an Zellen des Mononukleären Phagozytensystems (Monozyten, Makrophagen und Riesenzellen vom Fremdkörpertyp) sowie Lymphozyten, Plasmazellen, Fibroblasten und Endothelzellen. Ein zell-medierter Abbau von Kalziumphosphat-Granula durch Makrophagen oder osteoklastenartige Riesenzellen wurde in mehreren *in vivo* und *in vitro* Studien beschrieben^{91,93,94} und dabei keine Verzögerung der Knochenneubildung festgestellt³¹. In der vorliegenden Studie fanden der Abbau der MBCP-Granula (Gruppe C) überwiegend durch osteoklastenartige Fremdkörperriesenzellen und der Abbau der TCP-Granula (Gruppe D) hauptsächlich durch Makrophagen statt. Die deutlichen zellulären Reaktionen des umliegenden Gewebes bei beiden Gruppen im Zusammenhang mit reduzierter Knochenneubildung, der sich bildenden fibrösen Kapsel sowie der fehlenden Verbindung zwischen neugebildetem Knochen und residualem Hydrogel sprechen jedoch für eine Fremdkörperreaktion in Form einer chronisch granulomatösen Entzündung und nicht für einen physiologischen Abbauprozess. Die Vermutung liegt nahe, dass die dichte Struktur der Hydrogelmatrix eine undurchdringbare Barriere für Zellen, Gefäße und Gewebe darstellte und zusammen mit abgelösten Kalziumphosphat-Partikeln eine chronische Entzündungsreaktion induzierte.

Abgelöste Partikel werden von Makrophagen umhüllt und abgebaut. Ist jedoch ein vollständiger Abbau z.B aufgrund der Größe nicht möglich, kommt es zur Fusion und Bildung von Riesenzellen oder zum Zelltod der Makrophagen. Diese absterbenden Makrophagen bewirken die Freisetzung intrazellulärer Zytokine und Lysozyme, die mit einer lokalen Entzündungsreaktion und einer Erhöhung der Makrophagenzahl durch Chemotaxis und erhöhter Produktion in Verbindung gebracht werden. Ist ein vollständiger Abbau der phagozytierten Partikel über einen längeren Zeitraum nicht möglich, kann eine chronisch granulomatöse Entzündung entstehen⁹⁵, die zu einer Abstoßungsreaktion des Knochenersatzmaterials führen kann.

Da Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Homöostase der Knochenbildung und Resorption spielen und als Osteoklastenvorläuferzellen diskutiert werden, kann es im Verlauf einer chronischen Entzündung durch die exzessive Makrophagenaktivierung und Gefäßdegeneration zu einem erniedrigten pH-Wert und lokaler Knochendemineralisation mit anschließender Knochenresorption kommen⁹². Anzeichen einer derartigen Knochendemineralisation und Resorption konnten bei Gruppe C und dort besonders bei einem Schaf (Nr. 12143) beobachtet werden (Abb.17).

5.8 Schlussfolgerung und Perspektiven

In der vorliegenden Studie konnte die Eignung des Hydrogels mit offener Porenstruktur und geringer struktureller Beschaffenheit (Gruppe F) als Knochenersatzmaterial zur Behandlung großer segmentaler Defekte nachgewiesen werden. Das verwendete Fibringerüst in Verbindung mit PTH als osteoinduktiv wirkendem Mediator erzielte sehr gute, mit dem Goldstandard vergleichbare Resultate. Diese Ergebnisse zeigen, dass weitere Studien zur Erlangung der Zulassung lohnenswert sind, um das untersuchte Hydrogel als Knochenersatzmaterial zu etablieren. Zu empfehlen sind Langzeitstudien mit dem Ziel, Spätschäden wie systemische Nebenwirkungen durch den lokalen Einsatz von PTH mit regelmäßigen Blutkontrollen auszuschließen. Das Einsatzgebiet dieses Hydrogels beschränkt sich aufgrund seiner geringen strukturellen Beschaffenheit und des fehlenden Kontrastmittels jedoch auf nicht lasttragende Indikationen, die keine radiologische Kontrolle erfordern. Der Einsatz bei Operationen im Wirbelsäulenbereich ist deshalb nicht möglich.

Der Grund der mäßigen Ergebnisse der Komposites mit dichter Porenstruktur und höherer struktureller Beschaffenheit (Gruppe C und D) muss im Kontext von Gelformulation und gewählter Umgebungsbedingung gesehen werden. Durch das Entfernen des segmentalen Knochenstückes entstand ein ungünstiges Verhältnis von bioaktiver Knochenfläche und appliziertem Hydrogel. Durch die dichte Porenstruktur der beiden Komposites beschränkte sich ihre Resorption auf die Außengrenzen des Gels. Die Zusammensetzung sollte für den Einsatz bei einem segmentalen Tibiadeфекt jedoch so gewählt werden, dass das Einwandern von osteogenetischen Zellen begünstigt und ein Abbau des Gels auch zentrifugal mit gleichzeitiger, adäquater Bildung neuen Knochens möglich ist.

Die Eignung der Komposites mit dichter Porenstruktur sollte bei anderen medizinischen Indikationen z.B. einer Vertebroplastie überprüft werden. Hierbei sollten bessere Resultate erreicht werden, da sich das Hydrogel zwischen die Spongiosabälkchen verteilt und somit eine größere Resorptionsfläche entsteht.

Die Herstellung eines universellen Knochenersatzmaterials scheint nicht möglich. Die Herausforderung besteht darin, die einzelnen Komponenten hinsichtlich ihrer Menge und Zusammensetzung so zu kombinieren, dass sich ihre Eigenschaften optimal ergänzen und sich nicht negativ beeinflussen.

Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile.

6 Literaturverzeichnis

1. Le Nihouannen D, Saffarzadeh A, Aguado E, et al: Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites. *J Mater Sci Mater Med* 18:225-235, 2007
2. Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 260:920-926, 1993
3. Gotzen L, Garrel T, Hofmann C: Knochenersatz - Aktueller Stand und Perspektiven. In: Oestern HJ, Probst J, editors. 61. Jahrestag der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1997
4. Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, et al: In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 25:1439-1451, 2004
5. Moore WR, Graves SE, Bain GI: Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 71:354-361, 2001
6. Bauer TW, Muschler GF: Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*:10-27, 2000
7. von Doernberg MC, von Rechenberg B, Böhner M, et al: In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* 27:5186-5198, 2006
8. Burchardt H: Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 18:187-196, 1987
9. Sarkar MR, Wachter N, Patka P, et al: First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in human cancellous bone. *J Biomed Mater Res* 58:329-334, 2001
10. Biddulph SL: Bone donor site. Iliac crest or distal radius? *J Hand Surg [Br]* 24:645-646, 1999
11. Gerngross H, Burri C, Kinzl L, et al: [Complications at removal sites of autologous cancellous bone transplants]. *Aktuelle Traumatol* 12:146-152, 1982
12. Govindaraj S, Costantino PD, Friedman CD: Current use of bone substitutes in maxillofacial surgery. *Facial Plast Surg* 15:73-81, 1999
13. Lu JX, Flautre B, Anselme K, et al: Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med* 10:111-120, 1999
14. Sevastianov VI, Tseytlina EA: The activation of the complement system by polymer materials and their blood compatibility. *J Biomed Mater Res* 18:969-978, 1984
15. Böhner M: Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 31 Suppl 4:37-47, 2000
16. Cohen MS, Constantino PD, Friedman CD: Biology of implants used in head and neck surgery. *Facial Plast Surg Clin North Am* 7:17-33, 1999
17. Kuemmerle JM, Oberle A, Oechslin C, et al: Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty - an experimental study in sheep. *J Craniomaxillofac Surg* 33:37-44, 2005

18. Schenk RK: Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen. Hefte der Unfallheilkunde 216:23-35, 1991
19. Deramond H, Depriester C, Toussaint P: [Vertebroplasty and percutaneous interventional radiology in bone metastases: techniques, indications, contraindications]. Bull Cancer Radiother 83:277-282, 1996
20. Lewis G: Percutaneous vertebroplasty and kyphoplasty for the stand-alone augmentation of osteoporosis-induced vertebral compression fractures: present status and future directions. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 81:371-386, 2007
21. Lieberman IH, Togawa D, Kayanja MM: Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials. Spine J 5:305S-316S, 2005
22. Constantino PD, Phillips S: Biosynthetic materials in head and neck reconstruction. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 4:271-277, 1996
23. Rueger JM: [Bone substitution materials. Current status and prospects]. Orthopade 27:72-79, 1998
24. Frayssinet P, Trouillet JL, Rouquet N, et al: Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. Biomaterials 14:423-429, 1993
25. Bagot d'Arc M, Daculsi G: Micro macroporous biphasic ceramics and fibrin sealant as a moldable material for bone reconstruction in chronic otitis media surgery. A 15 years experience. J Mater Sci Mater Med 14:229-233, 2003
26. Daculsi G: Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. Biomaterials 19:1473-1478, 1998
27. LeGeros RZ: Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. Clin Mater 14:65-88, 1993
28. Eggli PS, Muller W, Schenk RK: Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. Clin Orthop Relat Res:127-138, 1988
29. Uchida A, Nade S, McCartney E, et al: The use of ceramics for bone replacement. A comparative study of three different porous ceramics. Bone Joint Surg 66:269-275, 1984
30. Shimazaki K, Mooney V: Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. J Orthop Res 3:301-310, 1985
31. Theiss F, Apelt D, Brand B, et al: Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. Biomaterials 26:4383-4394, 2005
32. Le Guehennec L, Layrolle P, Daculsi G: A review of bioceramics and fibrin sealant. Eur Cell Mater 8:1-10; discussion 10-11, 2004
33. Génot O: Evaluation von vier biodegradierbaren, injizierbaren Knochenzementen in eine experimentellen Studie in Schafen. Pferdeklinik der Vetsuisse Fakultät Zürich, Universität Zürich, 2006

34. Klawitter JJH: Application of Porous Ceramics for the Attachment of Load Bearing Internal Orthopedic Applications. *J Biomed Mater Res Symposium No.2 (Part 1)*:161-229, 1971
35. Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, et al: Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 19:133-139, 1998
36. Kuhne JH, Bartl R, Frisch B, et al: Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* 65:246-252, 1994
37. Luckey MM, Gilchrist N, Bone HG, et al: Therapeutic equivalence of alendronate 35 milligrams once weekly and 5 milligrams daily in the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Obstet Gynecol* 101:711-721, 2003
38. Handschel J, Wiesmann HP, Stratmann U, et al: TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials* 23:1689-1695, 2002
39. Niedhart C, Maus U, Redmann E, et al: In vivo testing of a new in situ setting beta-tricalcium phosphate cement for osseous reconstruction. *J Biomed Mater Res* 55:530-537, 2001
40. Damien CJ, Parsons JR: Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 2:187-208, 1991
41. Jarcho M: Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop Relat Res*:259-278, 1981
42. Wittkamp AR: Fibrin glue as cement for HA-granules. *J Craniomaxillofac Surg* 17:179-181, 1989
43. Marini E, Valdinucci F, Silvestrini G, et al: Morphological investigations on bone formation in hydroxyapatite-fibrin implants in human maxillary and mandibular bone. *Cells Mater* 4:231-246, 1994
44. Gasser B: About composite materials and their use in bone surgery. *Injury* 31 Suppl 4:48-53, 2000
45. Nakamura K, Koshino T, Saito T: Osteogenic response of the rabbit femur to a hydroxyapatite thermal decomposition product-fibrin glue mixture. *Biomaterials* 19:1901-1907, 1998
46. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, et al: Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol* 132:1177-1188, 1996
47. Takei A, Tashiro Y, Nakashima Y, et al: Effects of fibrin on the angiogenesis in vitro of bovine endothelial cells in collagen gel. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31:467-472, 1995
48. Schmoekel H, Schense JC, Weber FE, et al: Bone healing in the rat and dog with nonglycosylated BMP-2 demonstrating low solubility in fibrin matrices. *J Orthop Res* 22:376-381, 2004
49. Perka C, Schultz O, Spitzer RS, et al: Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials* 21:1145-1153, 2000

50. Abiraman S, Varma HK, Umashankar PR, et al: Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials* 23:3023-3031, 2002
51. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, et al: Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg* 31:27-33, 2003
52. Daculsi G, Bagot d'Arc M, Corlieu P, et al: Macroporous biphasic calcium phosphate efficiency in mastoid cavity obliteration: experimental and clinical findings. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101:669-674, 1992
53. Cunin G, Boissonnet H, Petite H, et al: Experimental vertebroplasty using osteoconductive granular material. *Spine* 25:1070-1076, 2000
54. Carmagnola D, Berglundh T, Araujo M, et al: Bone healing around implants placed in a jaw defect augmented with Bio-Oss. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 27:799-805, 2000
55. Carmagnola D, Berglundh T, Lindhe J: The effect of a fibrin glue on the integration of Bio-Oss with bone tissue. A experimental study in labrador dogs. *J Clin Periodontol* 29:377-383, 2002
56. Sabokbar A, Fujikawa Y, Murray DW, et al: Radio-opaque agents in bone cement increase bone resorption. *J Bone Joint Surg Br* 79:129-134, 1997
57. Wilmhurst JA, Brooks RA, Rushton N: The effects of particulate bone cements at the bone-implant interface. *J Bone Joint Surg Br* 83:588-592, 2001
58. Sabokbar A, Pandey R, Athanasou NA: The effect of particle size and electrical charge on macrophage-osteoclast differentiation and bone resorption. *J Mater Sci Mater Med* 14:731-738, 2003
59. Davenport D, Cohen MD, Hanna MP, et al: Studies of iodixanol in the rabbit lung and peritoneum. *Pediatr Radiol* 29:724-730, 1999
60. Nakamura M, Uozumi J, Soejima K, et al: Inhibition of gluconeogenesis and p-aminohipuric acid accumulation in rat renal cortical slices by ionic and nonionic contrast media. *Clin Exp Nephrol* 7:98-103, 2003
61. Almen T: Visipaque--a step forward. A historical review. *Acta Radiol Suppl* 399:2-18, 1995
62. de Wijn JR, Slooff TJ, Driessens FC: Characterization of bone cements. *Acta Orthop Scand* 46:38-51, 1975
63. Kjellson F, Wang JS, Almen T, et al: Tensile properties of a bone cement containing non-ionic contrast media. *J Mater Sci Mater Med* 12:889-894, 2001
64. Wang JS, Diaz J, Sabokbar A, et al: In vitro and in vivo biological responses to a novel radiopacifying agent for bone cement. *J R Soc Interface* 2:71-78, 2005
65. Jones CI, Goodall AH: Differential effects of the iodinated contrast agents Ioxaglate, Iohexol and Iodixanol on thrombus formation and fibrinolysis. *Thromb Res* 112:65-71, 2003
66. Bauer W, Albright F, Aub JC: Studies of calcium and phosphorus metabolism: II. The Calcium Excretion of Normal Individuals on a Low Calcium Diet, also Data on a Case of Pregnancy. *J Clin Invest* 7:75-96b, 1929
67. Harada S, Rodan GA: Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423:349-355, 2003

68. Rodan GA, Martin TJ: Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289:1508-1514, 2000
69. Potts JT: Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol* 187:311-325, 2005
70. Reeve J, Meunier PJ, Parsons JA, et al: Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. *Br Med J* 280:1340-1344, 1980
71. Tam CS, Heersche JN, Murray TM, et al: Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology* 110:506-512, 1982
72. Lindsay R, Nieves J, Formica C, et al: Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. *Lancet* 350:550-555, 1997
73. Lane NE, Sanchez S, Modin GW, et al: Parathyroid hormone treatment can reverse corticosteroid-induced osteoporosis. Results of a randomized controlled clinical trial. *J Clin Invest* 102:1627-1633, 1998
74. Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, et al: Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res* 16:1846-1853, 2001
75. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, et al: Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 344:1434-1441, 2001
76. Kimmel DB, Bozzato RP, Kronis KA, et al: The effect of recombinant human (1-84) or synthetic human (1-34) parathyroid hormone on the skeleton of adult osteopenic ovariectomized rats. *Endocrinology* 132:1577-1584, 1993
77. Nuss KM, Auer JA, Boos A, et al: An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disord* 7:67, 2006
78. Kemper M: Screeningversuch zur Optimierung synthetischer und fibriner Hydrogele als dreidimensionale Trägersubstanz für Bone Morphogenic Protein, Transforming Growth Factor β und Parathormon zur Beschleunigung der Knochenheilung. Pferdekl. der Vetsuisse Fakultät Zürich, Universität Zürich, 2003
79. Fuerst A, Derungs S, von Rechenberg B, et al: Use of a parathyroid hormone peptide (PTH(1-34))-enriched fibrin hydrogel for the treatment of a subchondral cystic lesion in the proximal interphalangeal joint of a warmblood filly. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54:107-112, 2007
80. Jung RE, Cochran DL, Domken O, et al: The effect of matrix bound parathyroid hormone on bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 18:319-325, 2007
81. Jung RE, Hammerle CH, Kokovic V, et al: Bone regeneration using a synthetic matrix containing a parathyroid hormone peptide combined with a grafting material. *Int J Oral Maxillofac Implants* 22:258-266, 2007
82. Schmitz JP, Hollinger JO, Milam SB: Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. *J Oral Maxillofac Surg* 57:1122-1126, 1999

83. LeGeros RZ: Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clin Orthop Relat Res:81-98, 2002
84. Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. Clin Orthop Relat Res: S. 56-65, 1998
85. Lippuner K, Vogel R, Tepic S, et al: Effect of animal species and age on plate-induced vascular damage in cortical bone. Arch Orthop Trauma Surg 111:78-84, 1992
86. Kümmerle JM: Experimentelle Studie über die Eignung eines neue Brushite Kalziumphosphatzements für die kraniofaziale Knochenchirurgie anhand eines ovinen Modells der parietalen Kranioplastik und maxillären Augmentation. Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, 2003
87. Hassler W, Zentner J: Radical osteoclastic craniectomy in sagittal synostosis. Neurosurgery 27:539-543, 1990
88. Augat P, Margevicius K, Simon J, et al: Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap. J Orthop Res 16:475-481, 1998
89. Nickel R, Schummer A, Wille K-H, et al: Bewegungsapparat: Verlag Paul Parey Berlin and Hamburg, 1992
90. Benghuzzi H: Cytological evaluation of capsular tissue surrounding TCPL implant in adult rats. Biomed Sci Instrum 32:81-86, 1996
91. Oberle A, Theiss F, Böhner M, et al: Investigation about the clinical use of brushite- and hydroxylapatite-cement in sheep. Schweiz Arch Tierheilkd 147:482-490, 2005
92. Lassus J, Salo J, Jiranek WA, et al: Macrophage activation results in bone resorption. Clin Orthop Relat Res:7-15, 1998
93. Malard O, Bouler JM, Guicheux J, et al: Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. J Biomed Mater Res 46:103-111, 1999
94. Pioletti DP, Takei H, Lin T, et al: The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions. Biomaterials 21:1103-1114, 2000
95. McGavin, Donald M, Zachary, et al: Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4 Rev ed, 2006

7 Abkürzungsverzeichnis

BMP-2	Bone Morphogenetic Protein-2
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HA	Hydroxyapatit
IDX	Iodixanol
IHX	Iohexanol
i.m.	intramuskulär
I.U.	Internationale Einheiten
i.v.	intravenös
LC-DCP	limited contact dynamic compression plate
MBCP	Mikro- und makroporöse Biphasische Kalziumphosphat
MMA	Methylmetacrylat
OP	Operation
PEG	Polyethylenglycol
PMMA	Polymethylmethacrylat
p.o.	per os
PTH	Parathormon
s.c.	subkutan
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
β -TCP	β -Trikalziumphosphat
VP	Perkutane Vertebroplastie
w/v	weight/volume

8 Anhang

8.1 Abbildungen

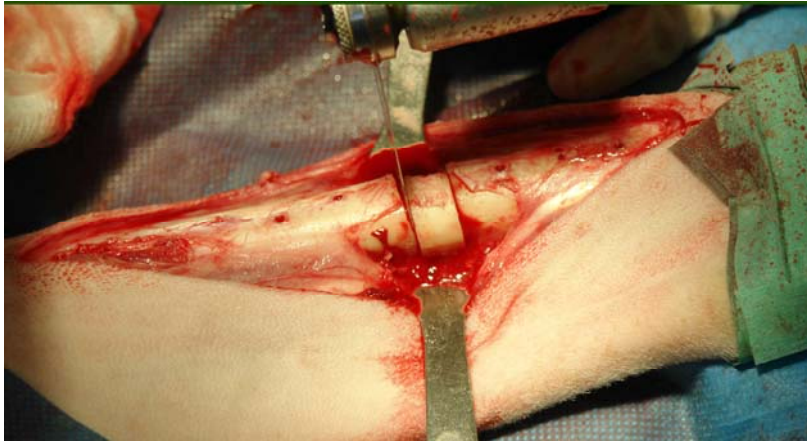


Abb. 1:

Durchführung der Osteotomie mit einer oszillierenden Säge; das Weichteilgewebe wird durch das Einsetzen von Hohmannhebeln von kranial und kaudal der Tibia geschützt.

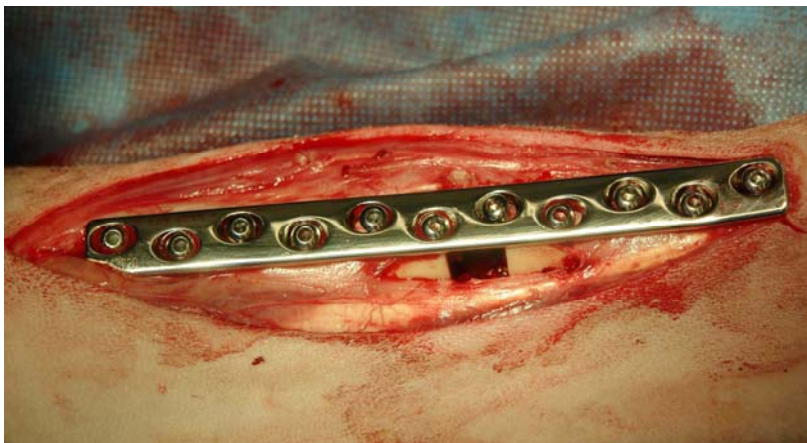


Abb. 2:

Osteotomie mit LC-DC Platte vor Injektion des Hydrogels

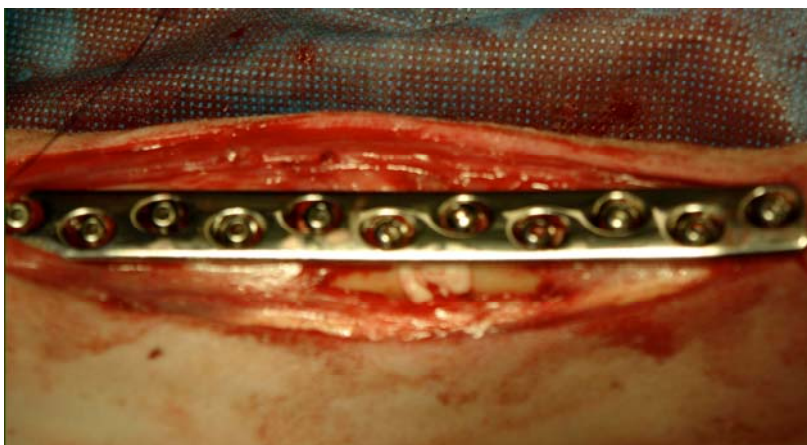


Abb. 3:

Osteotomie mit LC-DC-Platte nach Injektion des Hydrogels mit dichter Porenstruktur
Gruppe C



Abb. 4:

Tibiadefekt makroskopisch;

Gruppe C

Residuales Hydrogel mit dichter Porenstruktur ist als kompakte, weisse Masse sichtbar

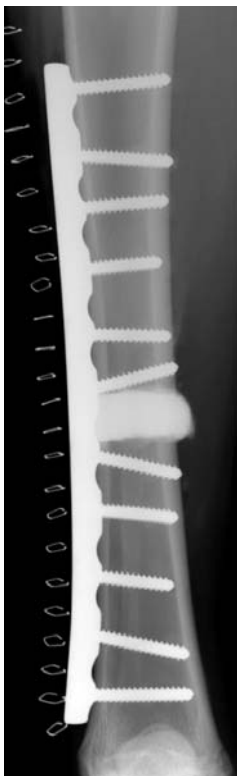


Abb. 5:

Postoperative Röntgenaufnahme

Gruppe C

Hydrogelmatrix infolge Kontrastmittelzugabe als röntgendichte, homogene Masse erkennbar, über den Trans-Kortex hinausreichend.

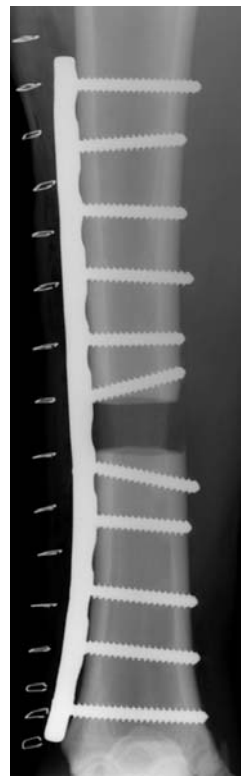


Abb. 6:

Postoperative Röntgenaufnahme;

Gruppe F

Hydrogelmatrix radiologisch nicht nachweisbar

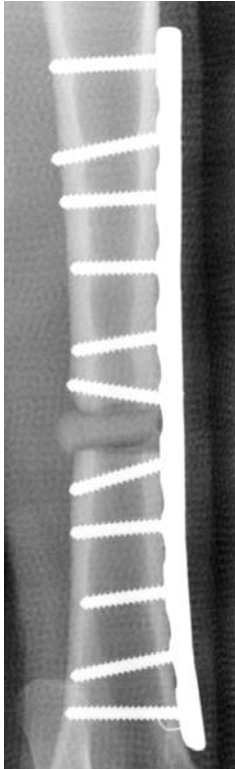


Abb. 7:

Röntgenaufnahme 8 Wochen post OP; ohne Abnahme des Castverbandes

Gruppe C

Residuales Hydrogel wölbt sich über den Trans-Kortex hervor und ist von feiner röntgendurchlässiger Zone umgeben



Abb. 8: Makroradiographie postmortem, 12Wo. post OP
Gruppe C

Residuales Hydrogel im Markbereich und an der Trans-Kortex; Cis-Kortex gering-gradige Kallusbildung

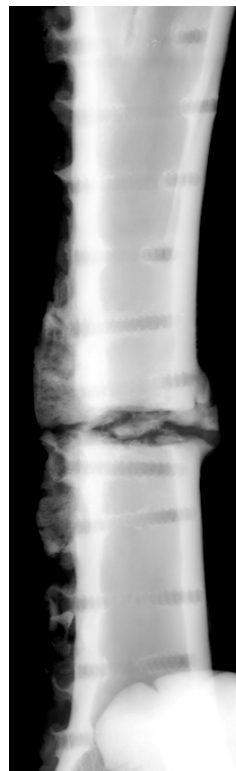


Abb. 9: Makroradiographie postmortem, 12Wo. post OP
Gruppe D

Weniger residuales Hydrogel als bei Gruppe C; deutlichere Kallusbildung an beiden Kortices



Abb. 10: Makroradiographie postmortem, 12Wo. post OP
Gruppe F

komplikationslose Heilung

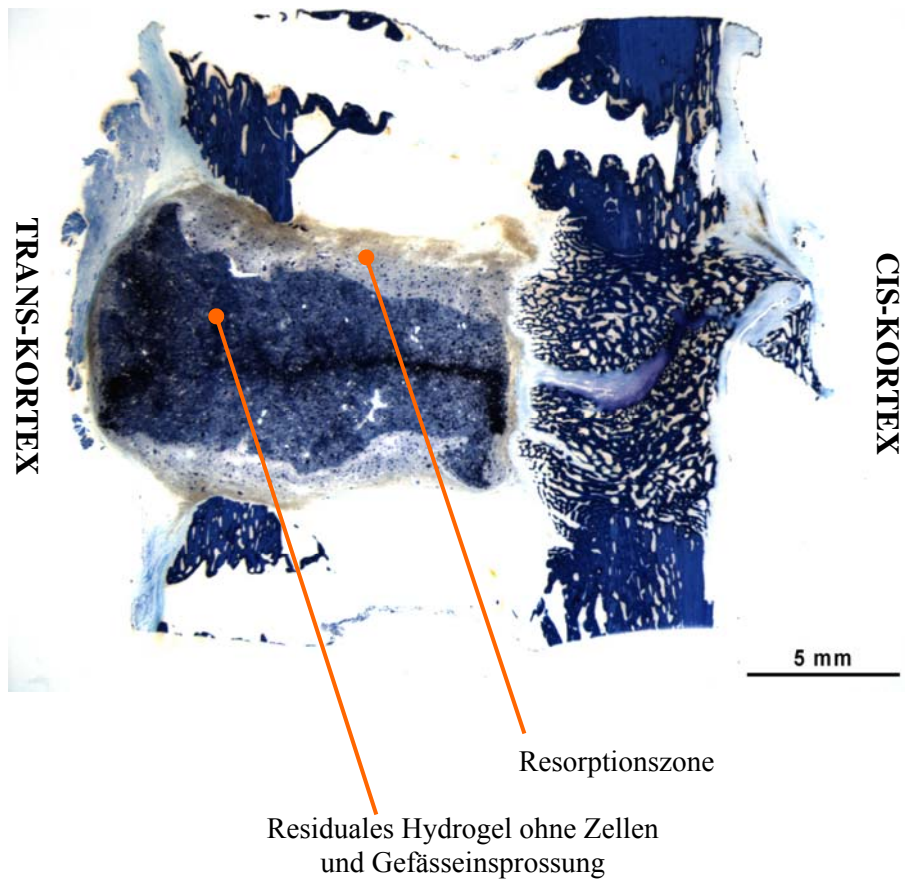


Abb. 11a:
Dickschnitt
Gruppe C
Schafnr.12141

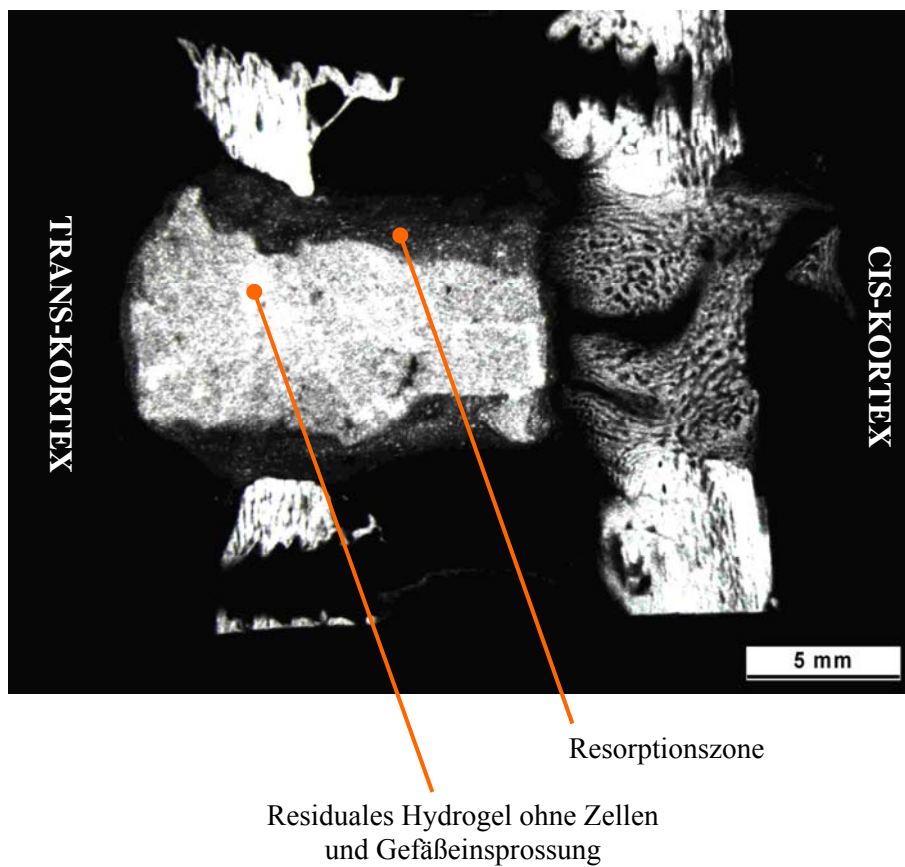


Abb. 11b:
Mikro-
radiographie
Gruppe C
Schafnr.12141

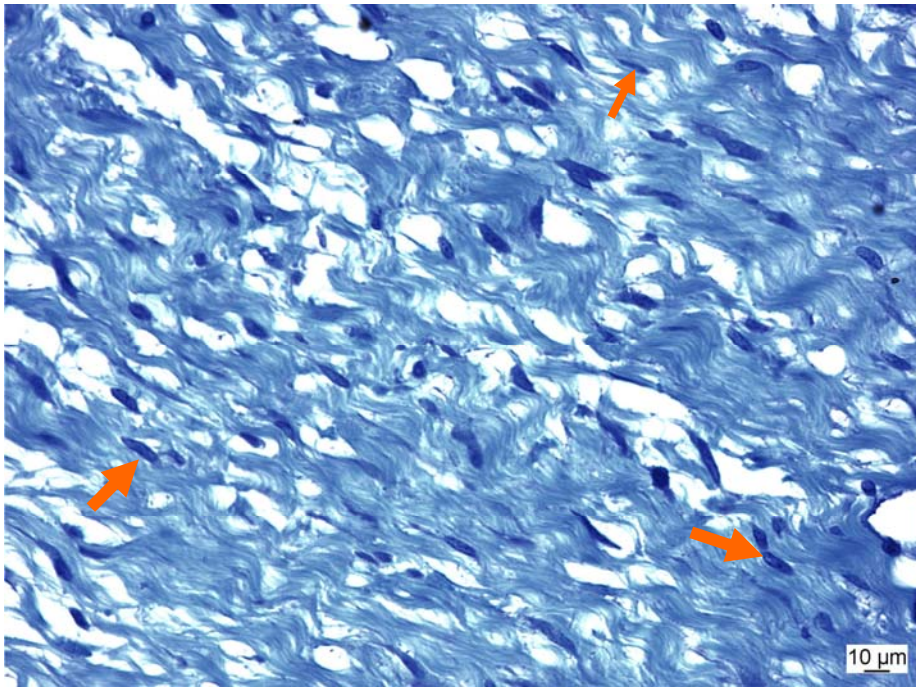


Abb. 12: Defektbereich, Toluidinblau;

Gruppe A

Lockeres fibröses Bindegewebe mit Fibroblasten (dicke Pfeile) und Fibrozyten (dünner Pfeil)

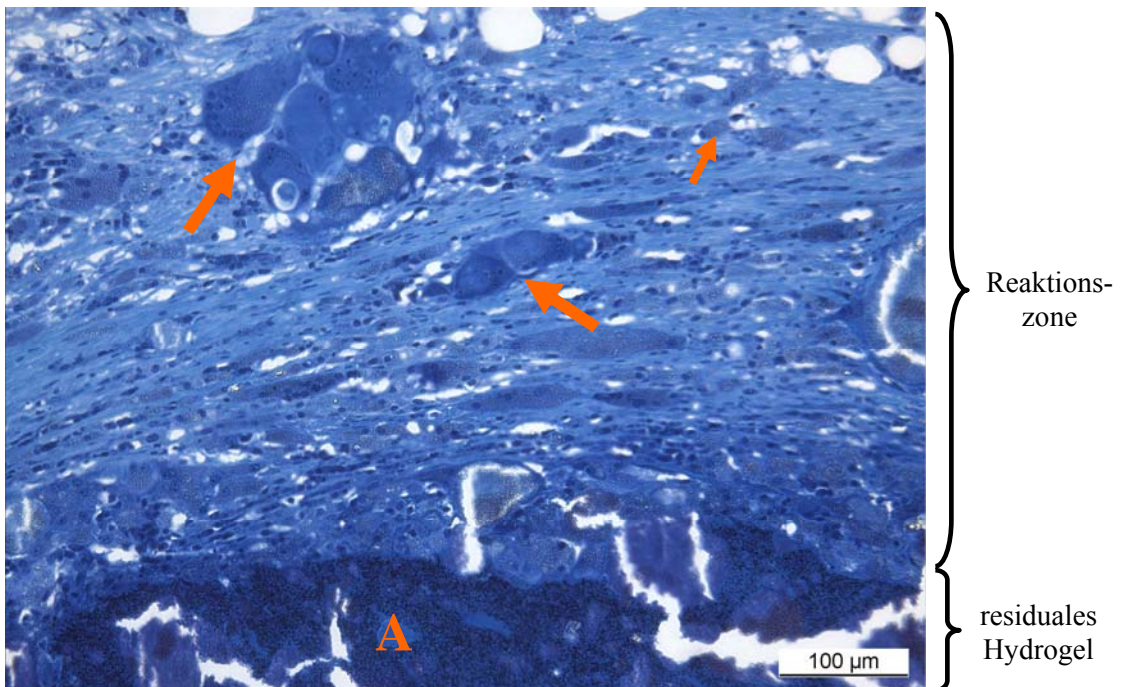


Abb. 13: Reaktionszone, Toluidinblau;

Gruppe C

A = residuales Hydrogel mit MBCP-Granula, ohne Zellen und Gefäße;
Beim Abbau der Gelmatrix mit deutlich ausgeprägte Fusion von Makrophagen (dünner Pfeil) zu Fremdkörperriesenzellen (dicke Pfeile)

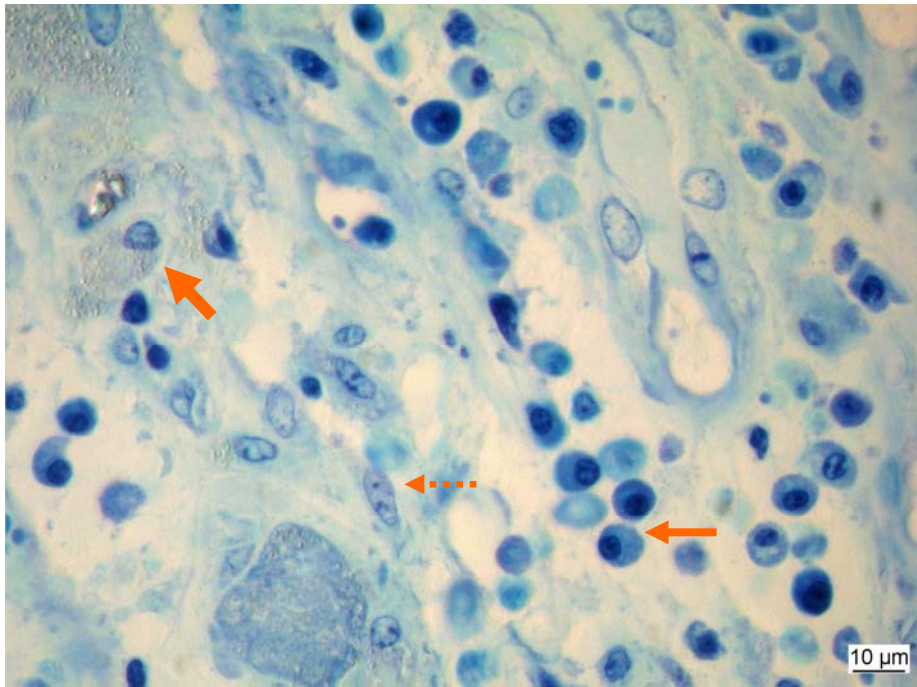


Abb. 14: Resorptionszone, Toluidinblau;

Gruppe C

Plasmazellen (dünner Pfeil), Makrophagen (dicker Pfeil) und Mesenchymzellen (gestrichelter Pfeil)

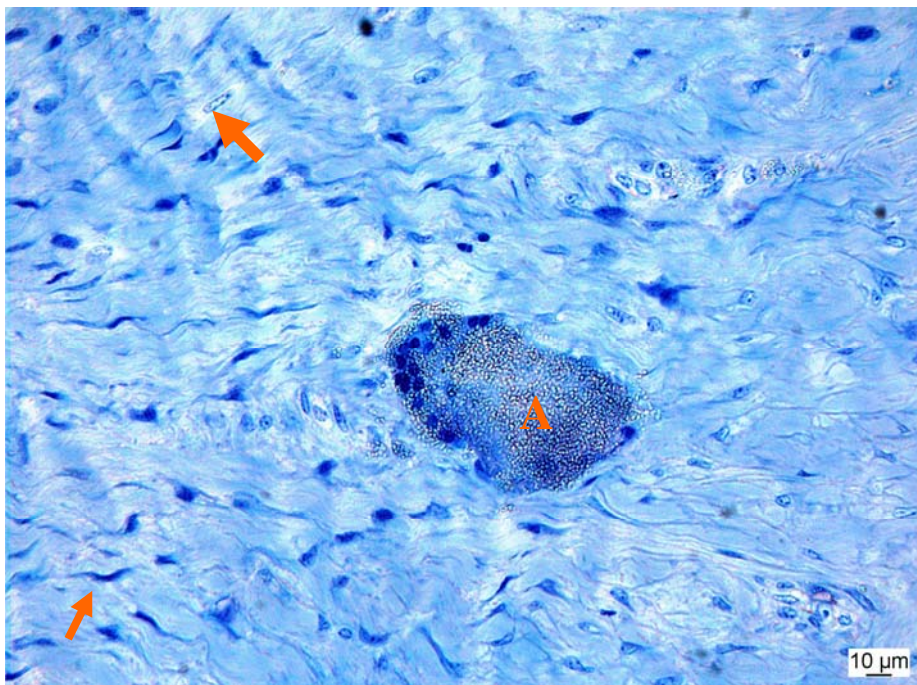


Abb. 15: Resorptionszone, Toluidinblau;

Gruppe C

Fremdkörperriesenzelle (A) mit phagozytierten MBCP-Granula und peripher liegenden Zellkernen, umgeben von Bindegewebe, Fibrozyten (dünner Pfeil) und vereinzelt Mesenchymzellen (dicker Pfeil)

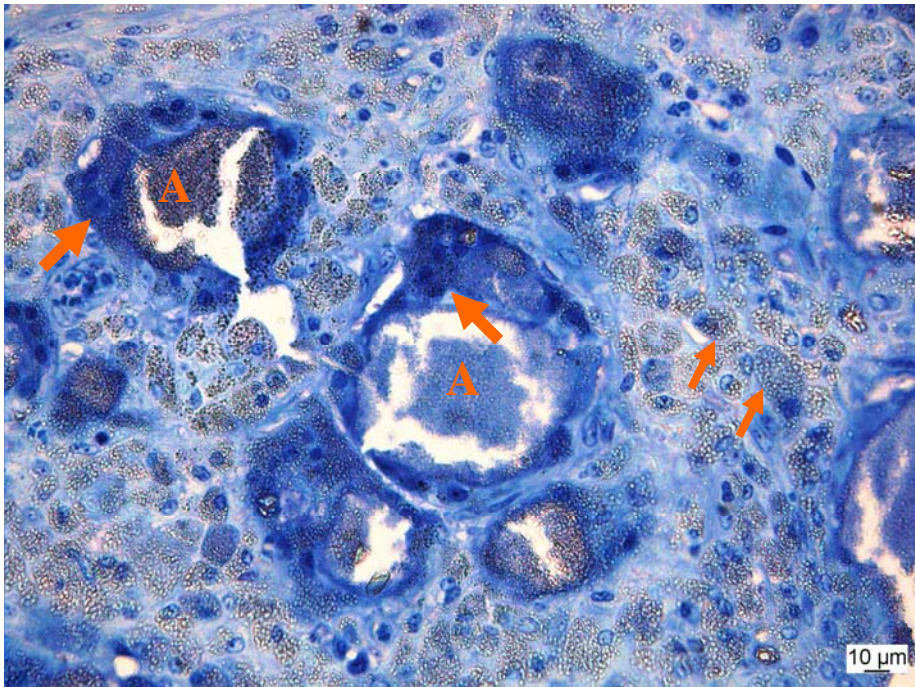


Abb. 16: Resorptionszone, Toluidinblau;

Gruppe C, A = residuale Hydrogelmatrix mit MBCP-Granula;

Fremdkörperriesenzellen (dicke Pfeile) und Makrophagen (dünne Pfeile) mit phagozytierten MBCP-Granula, die als lichtbrechende Partikel im Zytoplasma zu sehen sind. Der Zellkerne der Makrophagen sind in die Peripherie verdrängt.

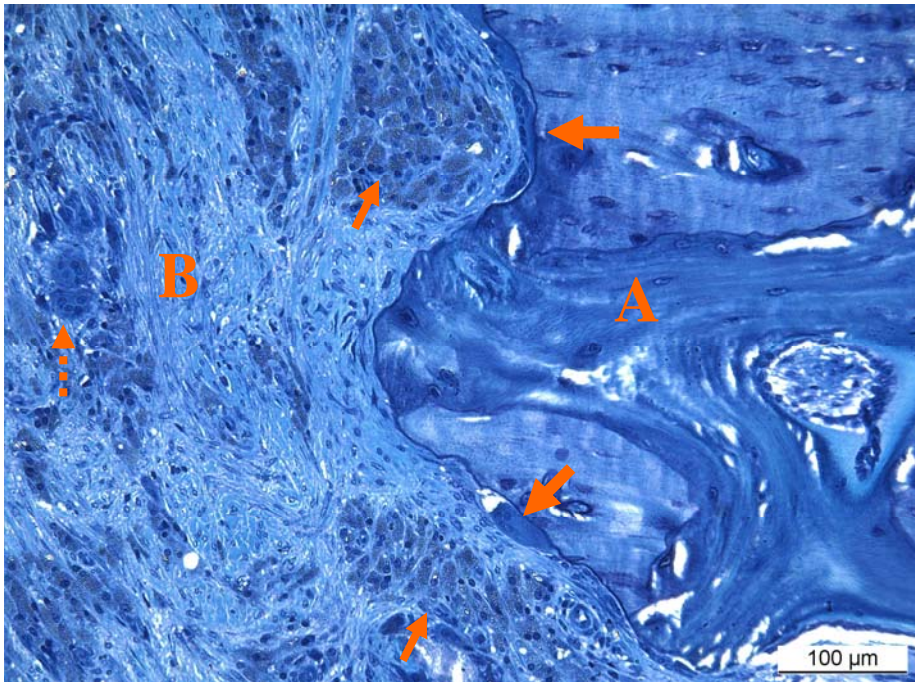


Abb. 17: Osteolyse a.d. Trans-Kortex, Toluidinblau

Gruppe C, Schafnr. 12143;

Es konnte weder ein Osteoblastensaum noch neu gebildetes Osteoid in diesem Bereich nachgewiesen werden; Osteoklasten (dicke Pfeile) liegen der Knochenmatrix (A) direkt auf. Im Defektbereich befindet sich fibröses Bindegewebe (B) mit Makrophagenansammlungen (dünne Pfeile) und Fremdkörperriesenzellen (gestrichelter Pfeil)

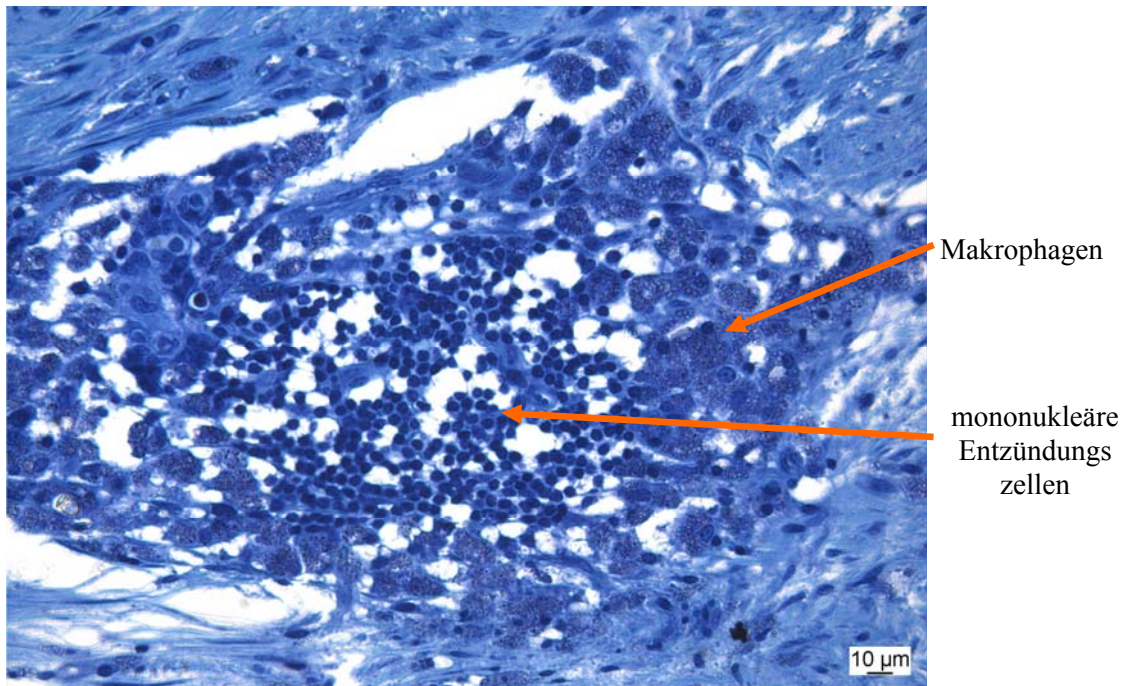


Abb. 18: Resorptionszone, Toluidinblau;
Gruppe D
Ansammlung von mononukleären Entzündungszellen, sowie Makrophagen

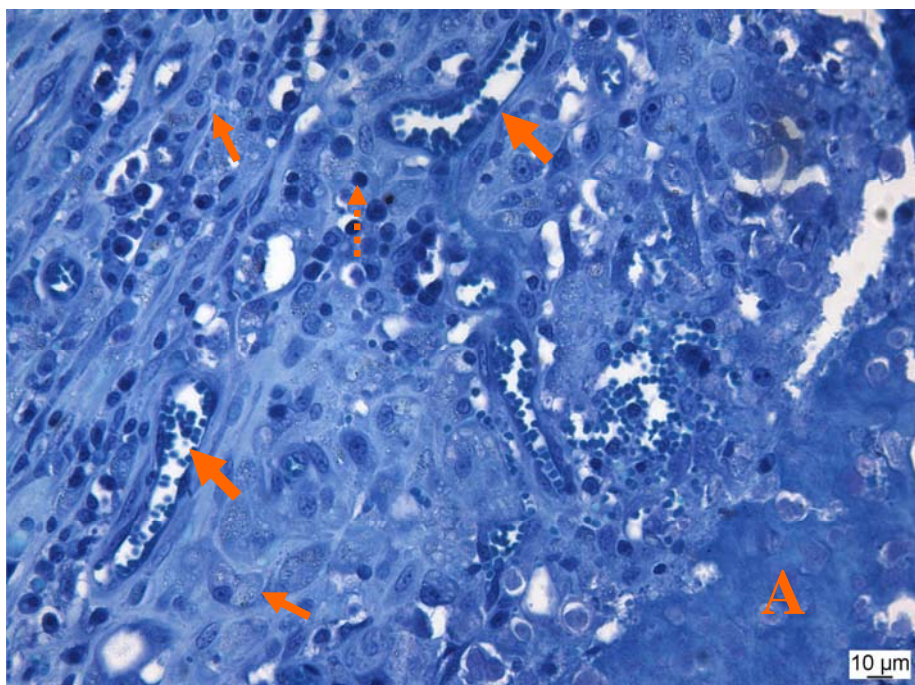


Abb. 19: Resorptionszone, Toluidinblau,
Gruppe D
A = Hydrogelmatrix mit β -TCP-Granula ohne Zellen und Gefäße;
In der Resorptionzone konnten unter anderem eingesprossste Gefäße (dicke Pfeile), Makrophagen (dünne Pfeile) und lymphozytäre Zellen (gestrichelter Pfeil) und nur wenige Riesenzellen angetroffen werden

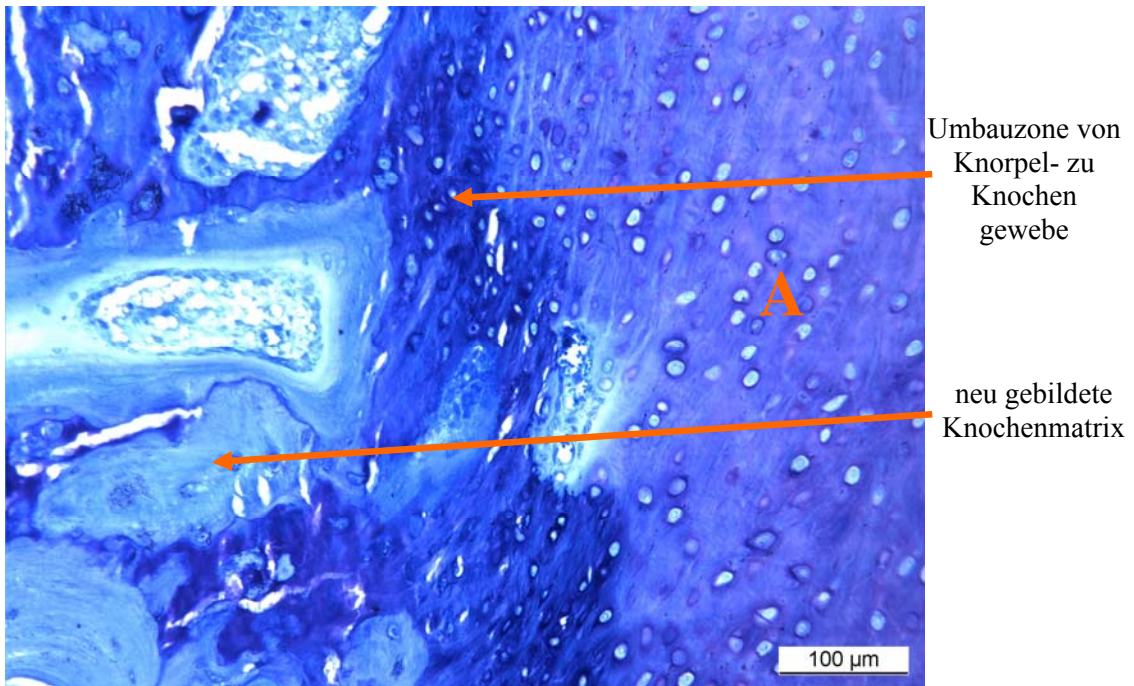


Abb. 20: Defektbereich;

Gruppe F

A = Knorpelgewebe;

Enchondrale Ossifikation, links im Bild neu gebildete Knochenmatrix , rechts hyaliner Knorpel (A)

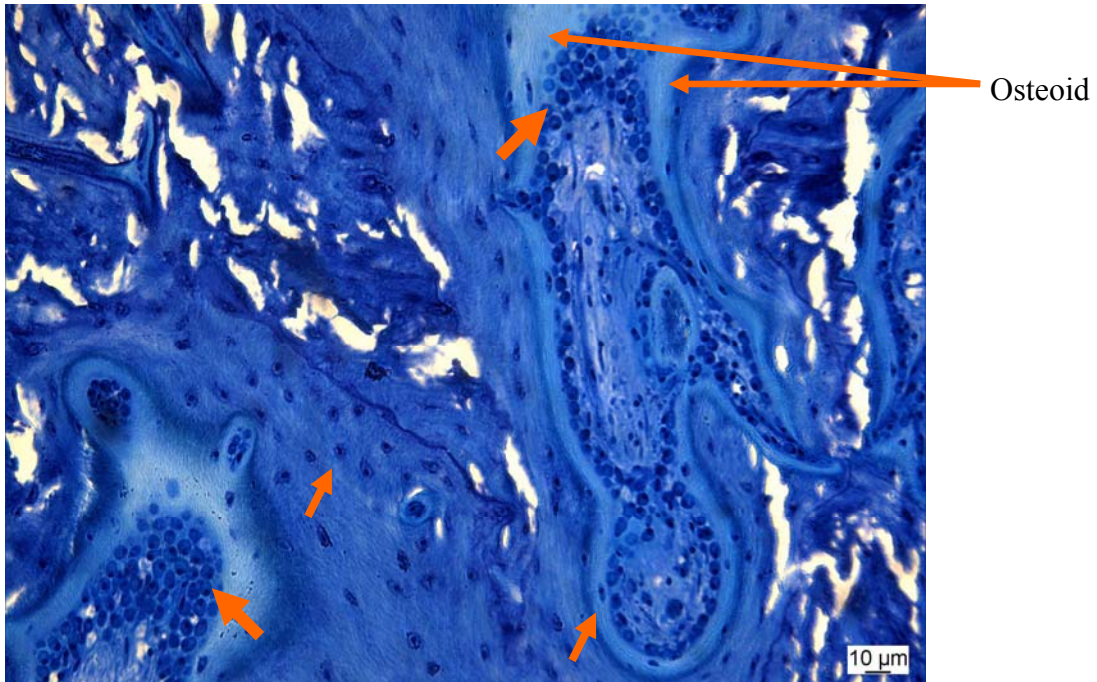


Abb. 21: Defektbereich; Toluidinblau

Gruppe F

Neugebildeter Knochen mit aktiven, palisadenartig angeordneten Osteoblasten (dicke Pfeile); auffallend ist ihre runde, hypertrophische Form; darunter liegend, das von ihnen neu gebildete Osteoid;

Osteozyten sind (dünne Pfeile) sowohl im Osteoid, als auch im Geflechtknochen eingemauert zu finden.

8.2 Tabellen

Tabelle A. 1: Ergebnisse der radiologischen Auswertung mittels Scoresystem; Score siehe Seite 23

Gruppe	Nummer	Cis			Trans			Materialrest		
		4 Wo	8 Wo	12 Wo	4 Wo	8 Wo	12 Wo	4 Wo	8 Wo	12 Wo
A Leerprobe	12117	0	2	3	0	0,5	0	-	-	-
	12119	0	0	0,5	0	0	0	-	-	-
	12124	0	2	2	0	0	0	-	-	-
	12125	0	2	2	2	2	2	-	-	-
	12137	0	0	2,25	0	0	0	-	-	-
	12156	0	0	NA	0,5	0	NA	-	-	-
B Autologe Spongiosa	1275	0	2,0	2,5	1,5	1,75	1,75	1	2	2
	1276	0	2,75	3	2,5	2,75	2,75	2	2	2
	12126	0,5	2	2,5	1	2	2,5	1,5	1	2
	12127	2	3	3	3	2,75	2	0	0,5	2
	12128	NA	2	2,75	NA	1	1		2	2
C Fibrinmatrix Kontrastmittel 2µm MBCP PTH	12138	0	1,5	2	0	0,5	1	0	0	0
	12139	0	0	2	0,5	0	0	0	0	0
	12140	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	12141	0	1	2,25	0	0	0	0	0	1
	12142	0	0	2,5	1	2	1	0	0	0
	12143	0	0	2	0,5	0	0	0	0	0
D Fibrinmatrix Kontrastmittel 10µm TCP PTH	12163	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	12164	0	0	2	0	0,5	0	0	0	0
	12165	0	2	2	0	0	0	0	0	0
	12166	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	12167	0	1,5	2	1	2	2	0	0	0
	12168	0	0,5	1,5	0	1	2,75	0	0	0
E Fibrinmatrix Kontrastmittel PTH	12199	0	2	2,5	0	0	0	-	-	-
	12200	0	2	2	1	2	2	-	-	-
	12201	0,25	2	2	0	0	0	-	-	-
	12202	0	0	1,75	0	0,5	0,5	-	-	-
	12203	0	1,75	2	2,75	2,75	3	-	-	-
	12204	0	0	1,5	0	0	0,5	-	-	-
F Fibrinmatrix PTH	12108	0	0,5	1	2	3	3	-	-	-
	12109	0	2	3	0	2,5	3	-	-	-
	12110	NA	2	2	2,5	3	2,5	-	-	-
	12111	0	0	3	1,5	1,5	3	-	-	-
	12112	0	2	3	2	2,5	2,5	-	-	-
	12113	0	0	3	0	3	3	-	-	-

Tabelle A. 2: Ergebnisse der Histomorphometrie; Angaben in Pixel (1Pixel = 2,47µm);

Gruppe	Schaf-Nr.	Gesamt- fläche	Hinter- grund	Alte Knochen- matrix	Neue Knochen- matrix	Fibröses Gewebe	Hydrogel
A Leerprobe	12117	37442000	24864200	1708200	1592400	9277200	0
	12119	37442000	26335700	1583000	1366800	8156500	0
	12124	37442000	23605000	1811000	2607200	9418800	0
	12125	37442000	20658800	2489300	1867900	12426000	0
	12137	37442000	26729370	412030	2123900	8176700	0
	12156	37442000	23403600	2565800	1082600	10390000	0
B Autologe Spongiosa	1275	37442000	23664500	2376300	7571800	3829400	0
	1276	37442000	21634400	3172100	7632800	5002700	0
	12126	37442000	23851400	1548900	5951100	6090600	0
	12127	37442000	21847700	2078900	6032400	7483000	0
	12128	37442000	21278950	657250	7632300	7873500	0
C Fibrinmatrix Kontrastmittel 2µm MBCP PTH	12138	37442000	23046510	887490	2173100	6619500	4715400
	12139	37442000	23067240	832770	927490	5306000	7308500
	12140	37442000	24332650	699750	2813900	4599300	4996400
	12141	37442000	23457340	768860	2269800	3813000	7133000
	12142	37442000	23021900	2105700	3000800	6040800	3272800
	12143	37442000	24514160	1166800	417540	3610000	7733500
D Fibrinmatrix Kontrastmittel 10µm TCP PTH	12163	37442000	25536930	979770	1056500	4565500	5303300
	12164	37442000	26953400	1172900	2431700	5782900	1101100
	12165	37442000	24132780	507020	2827500	6247500	3727200
	12166	37442000	24443300	1683600	2669200	6162400	2483500
	12167	37442000	21646100	2402500	3610800	7667700	2114900
	12168	37442000	24687890	776320	8003500	3123900	850390
E Fibrinmatrix Kontrastmittel PTH	12199	37442000	24595950	300110	4197700	8097900	250340
	12200	37442000	22474200	2436200	2784900	9746700	0
	12201	37442000	24920640	1111700	2046800	8931800	431060
	12202	37442000	25756700	2340500	1512700	7832100	0
	12203	37442000	17298000	3204100	10478000	6461900	0
	12204	37442000	25495310	1821300	1683400	8317800	124190
F Fibrinmatrix PTH	12108	37442000	22416200	1672600	5192000	8161200	0
	12109	37442000	21911820	574980	9004700	5950500	0
	12110	37442000	18470900	1324700	6447400	11199000	0
	12111	37442000	23624900	471900	8827600	4517600	0
	12112	37442000	19437000	1616900	7282200	9105900	0
	12113	37442000	21233100	1015000	5138900	10055000	0

Tabelle A. 3: Ergebnisse der histologischen Auswertung mononukleärer Zellen mittels Scoresystem
 Score siehe Seite 25

MONONUKLEÄRE ZELLEN													
Gruppe	Schaf Nr.	Cis		Trans		Defekt			Cis	Trans	Fragment	Defekt	Total
		I	II	I	II	I	II	III	Gesamt	Gesamt	Gesamt	Gesamt	
A Leerprobe	12117	1	1	1	0	1	1	1	2	1	3	3	6
	12119	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	3	4
	12124	1	1	0	1	1	1	1	2	1	3	3	6
	12125	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	3	4
	12137	0	1	1	0	1	1	1	1	1	2	3	5
	12156	0	1	1	0	1	0	0	1	1	2	1	3
B Autologe Spongiosa	1275	0	1	1	0	0	1	1	1	1	2	2	4
	1276	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
	12126	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	3	4
	12127	1	1	1	0	1	1	1	2	1	3	3	6
	12128	1	1	1	1	1	1	0	2	2	4	2	6
C Fibrinmatrix Kontrastmittel 2µm MBCP PTH	12138	0	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	6
	12139	1	1	1	1	2	2	3	2	2	4	7	11
	12140	0	0	1	2	1	2	2	0	3	3	5	8
	12141	0	0	2	1	3	2	0	0	3	3	5	8
	12142	0	0	0	2	1	2	1	0	2	2	4	6
	12143	1	1	2	0	3	1	3	2	2	4	7	11
D Fibrinmatrix Kontrastmittel 10µm TCP PTH	12163	0	1	0	1	3	2	1	1	1	2	6	8
	12164	1	1	2	1	2	0	1	2	3	5	3	8
	12165	1	1	1	2	0	0	1	2	3	5	1	6
	12166	1	1	1	1	1	2	1	2	2	4	4	8
	12167	1	1	1	1	2	2	1	2	2	4	5	9
	12168	1	1	2	1	2	1	3	2	3	5	6	11
E Fibrinmatrix Kontrastmittel PTH	12199	1	1	1	1	1	3	1	2	2	4	5	9
	12200	1	1	1	0	0	1	1	2	1	3	2	5
	12201	1	1	1	1	1	1	1	2	2	4	3	7
	12202	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	3	4
	12203	0	0	1	1	1	1	0	0	2	2	2	4
	12204	1	0	1	1	1	2	0	1	2	3	3	6
F Fibrinmatrix PTH	12108	1	1	0	1	1	1	2	2	1	3	4	7
	12109	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	3	4
	12110	0	1	0	1	1	1	1	1	1	2	3	5
	12111	1	0	1	0	1	0	0	1	1	2	1	3
	12112	1	1	1	1	0	1	1	2	2	4	2	6
	12113	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	2	3

Tabelle A. 4: Ergebnisse der histologischen Auswertung der Makrophagen mittels Scoresystem
 Score siehe Seite 25

MAKROPHAGEN													
Gruppe	Schaf Nr.	Cis		Trans		Defekt			Cis	Trans	Fragment	Defekt	Total
		I	II	I	II	I	II	III	Gesamt	Gesamt	Gesamt	Gesamt	
A Leerprobe	12117	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	2	3
	12119	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	2	3
	12124	1	1	0	1	1	1	1	2	1	3	3	6
	12125	1	1	1	1	1	1	1	2	2	4	3	7
	12137	0	1	1	0	0	1	1	1	1	2	2	4
	12156	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B Autologe Spongiosa	1275	0	1	1	0	0	1	1	1	1	2	2	4
	1276	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2
	12126	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	3	4
	12127	1	1	1	0	1	1	1	2	1	3	3	6
	12128	1	0	1	0	1	1	0	1	1	2	2	4
C Fibrinmatrix Kontrastmittel 2µm MBCP PTH	12138	1	2	0	2	3	3	2	3	2	5	8	13
	12139	2	3	3	2	2	2	2	5	5	10	6	16
	12140	1	1	2	3	2	2	2	2	5	7	6	13
	12141	1	0	2	2	2	2	0	1	4	5	4	9
	12142	0	0	0	2	2	3	1	0	2	2	6	8
	12143	2	2	3	0	2	2	1	4	3	7	5	12
D Fibrinmatrix Kontrastmittel 10µm TCP PTH	12163	0	2	0	1	2	3	2	2	1	3	7	10
	12164	1	2	2	1	1	0	2	3	3	6	3	9
	12165	1	1	1	2	0	0	1	2	3	5	1	6
	12166	1	0	1	1	1	2	1	2	2	4	4	8
	12167	1	0	1	2	1	1	1	2	3	5	3	8
	12168	2	0	2	2	1	1	2	3	4	7	4	11
E Fibrinmatrix Kontrastmittel PTH	12199	0	1	1	1	1	2	0	1	2	3	3	6
	12200	1	1	0	0	0	1	1	2	0	2	2	4
	12201	0	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	6
	12202	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	3	4
	12203	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	3	4
	12204	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	2
F Fibrinmatrix PTH	12108	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	2	3
	12109	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	3	4
	12110	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	2
	12111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12112	1	1	1	1	0	1	1	2	2	4	2	6
	12113	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	2

Tabelle A. 5: Ergebnisse der histologischen Auswertung der mehrkernigen Riesenzellen mittels Scoresystem; Score siehe Seite 25

MEHRKERNIGE RIESENZELLEN													
Gruppe	Schaf Nr.	Cis		Trans		Defekt			Cis	Trans	Fragment	Defekt	Total
		I	II	I	II	I	II	III	Gesamt	Gesamt	Gesamt	Gesamt	
A Leerprobe	12117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12119	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12124	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2
	12125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12137	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
	12156	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B Autologe Spongiosa	1275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1276	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12126	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
	12127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12128	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
C Fibrinmatrix Kontrastmittel 2µm MBCP PTH	12138	0	0	0	1	3	3	1	0	1	1	7	8
	12139	1	2	3	1	2	3	3	3	4	7	8	15
	12140	0	1	1	2	1	1	2	1	3	4	4	8
	12141	1	0	3	1	3	3	0	1	4	5	6	11
	12142	0	0	0	1	2	2	0	0	1	1	4	5
	12143	2	3	2	0	3	3	3	5	2	7	9	16
D Fibrinmatrix Kontrastmittel 10µm TCP PTH	12163	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
	12164	0	1	1	2	1	0	1	1	3	4	2	6
	12165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12166	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	2	3
	12167	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	2
	12168	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	2
E Fibrinmatrix Kontrastmittel PTH	12199	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12200	0	1	1	0	0	0	0	1	1	2	0	2
	12201	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12203	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F Fibrinmatrix PTH	12108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12109	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle A. 6: Ergebnisse der histologischen Auswertung der Osteoklasten mittels Scoresystem

OSTEOKLASTEN													
Gruppe	Schaf Nr.	Cis		Trans		Defekt			Cis	Trans	Fragment	Defekt	Total
		I	II	I	II	I	II	III	Gesamt	Gesamt	Gesamt	Gesamt	
A Leerprobe	12117	1	1	1	0	0	0	0	2	1	3	0	3
	12119	1	1	1	1	0	1	1	2	2	4	2	6
	12124	1	1	1	1	0	0	1	2	2	4	1	5
	12125	1	0	0	1	0	1	1	1	1	2	2	4
	12137	0	1	2	0	0	0	0	1	2	3	0	3
	12156	0	1	1	0	0	0	0	1	1	2	0	2
B Autologe Spongiosa	1275	1	1	0	1	0	0	0	2	1	3	0	3
	1276	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2	0	2
	12126	1	1	0	1	1	0	0	2	1	3	1	4
	12127	1	1	0	1	1	1	1	2	1	3	3	6
	12128	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
C Fibrinmatrix Kontrastmittel 2µm MBCP PTH	12138	1	1	2	1	0	0	1	2	3	5	1	6
	12139	1	1	2	2	0	0	0	2	4	6	0	6
	12140	1	1	1	1	0	0	0	2	2	4	0	4
	12141	2	2	1	1	0	0	1	4	2	6	1	7
	12142	1	1	1	0	0	0	1	2	1	3	1	4
	12143	1	1	1	2	0	0	0	2	3	5	0	5
D Fibrinmatrix Kontrastmittel 10µm TCP PTH	12163	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0	3
	12164	1	1	2	0	0	0	0	2	2	4	0	4
	12165	0	1	1	2	0	0	2	1	3	4	2	6
	12166	1	1	1	0	0	0	0	2	1	3	0	3
	12167	1	2	2	1	0	0	0	3	3	6	0	6
	12168	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2	0	2
E Fibrinmatrix Kontrastmittel PTH	12199	1	1	1	1	0	0	1	2	2	4	1	5
	12200	1	2	1	2	0	0	0	3	3	6	0	6
	12201	1	1	1	1	0	0	0	2	2	4	0	4
	12202	1	1	3	2	0	0	0	2	5	7	0	7
	12203	1	1	0	0	0	1	1	2	0	2	2	4
	12204	1	0	3	1	0	0	1	1	4	5	1	6
F Fibrinmatrix PTH	12108	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	2
	12109	1	1	2	2	1	1	1	2	4	6	3	9
	12110	1	0	1	1	1	0	1	1	2	3	2	5
	12111	1	1	1	1	1	1	1	2	2	4	3	7
	12112	0	1	1	1	1	0	1	1	2	3	2	5
	12113	1	1	1	1	1	1	0	2	2	4	2	6

Tabelle A. 7: Ergebnisse der histologischen Auswertung der Fibroblasten/-zyten mittels Scores

FIBROBLASTEN/FIBROZYTEN													
Gruppe	Schaf Nr.	Cis		Trans		Defekt			Cis	Trans	Fragment	Defekt	Total
		I	II	I	II	I	II	III	Gesamt	Gesamt	Gesamt	Gesamt	
A Leerprobe	12117	0	1	3	3	3	3	3	1	6	7	9	16
	12119	3	1	2	3	3	3	1	4	5	9	7	16
	12124	0	0	1	1	1	0	0	0	2	2	1	3
	12125	0	0	1	0	3	1	1	0	1	1	5	6
	12137	0	3	3	0	3	3	3	3	3	6	9	15
	12156	0	2	2	1	3	3	3	2	3	5	9	14
B Autologe Spongiosa	1275	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	4	4
	1276	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12126	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
	12127	0	0	0	1	2	0	0	0	1	1	2	3
	12128	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
C Fibrinmatrix Kontrastmittel 2µm MBCP PTH	12138	0	0	3	2	2	2	1	0	5	5	5	10
	12139	1	1	2	2	2	2	2	2	4	6	6	12
	12140	0	1	2	2	2	2	3	1	4	5	7	12
	12141	0	0	2	2	2	2	0	0	4	4	4	8
	12142	0	0	2	1	3	2	0	0	3	3	5	8
	12143	2	2	2	3	3	1	2	4	5	9	6	15
D Fibrinmatrix Kontrastmittel 10µm TCP PTH	12163	0	2	3	2	3	3	3	2	5	7	9	16
	12164	0	0	2	1	1	0	2	0	3	3	3	6
	12165	0	0	3	1	0	0	1	0	4	4	1	5
	12166	0	2	3	2	3	3	3	2	5	7	9	16
	12167	0	1	0	1	2	3	2	1	1	2	7	9
	12168	0	0	2	1	1	0	1	0	3	3	2	5
E Fibrinmatrix Kontrastmittel PTH	12199	0	1	1	1	1	2	0	1	2	3	3	6
	12200	0	0	1	1	3	3	3	0	2	2	9	11
	12201	0	1	2	2	3	3	3	1	4	5	9	14
	12202	1	1	1	1	3	3	3	2	2	4	9	13
	12203	0	1	1	1	3	2	0	1	2	3	5	8
	12204	0	0	1	0	3	3	1	0	1	1	7	8
F Fibrinmatrix PTH	12108	2	2	0	0	0	2	2	4	0	4	4	8
	12109	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
	12110	1	1	0	2	1	2	2	2	2	4	5	9
	12111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12112	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	2	3
	12113	1	1	0	0	0	1	1	2	0	2	2	4

Danksagung

Von ganzem Herzen danke ich an dieser Stelle meiner Chefin **Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg** für die herzliche Aufnahme in ihre Abteilung, die Überlassung des Themas sowie ihre unermüdliche fachliche und vor allem menschliche Unterstützung. Mit bemerkenswerter Geduld und Präzision lehrt sie mich, chirurgische Eingriffe selbstständig durchzuführen, und ist mir eine große Hilfe bei der Suche des richtigen Weges für mein weiteres berufliches Leben.

Bei Herrn **Prof. Dr. Jörg A. Auer**, Direktor der Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät Zürich, möchte ich mich herzlich für die freundliche Unterstützung der MSRU bedanken.

Herrn **Prof. Dr. Hans Geyer** danke ich vielmals für die Übernahme des Korreferates.

Dem Radiologen-Team **Prof. Dr. Mark Flückiger**, **Prof. Dr. Joe Morgan** und im Besonderen **Dr. Stefanie Ohlerth** danke ich vielmals für ihre freundliche und umfassende Hilfe beim Auswerten der Röntgenbilder.

Vielen Dank auch an **Kati Zlinsky** und **Sabina Wunderlin** für die geduldigen Einweisungen und die hervorragende Arbeit bei der Herstellung der histologischen Präparate.

Frau **Dr. Monika Hilbe**, Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich, danke ich für ihre Hilfe bei der histologischen Auswertung.

Ein herzliches Dankeschön auch an meine Kollegen aus der MSRU: **Jens Langhoff**, **Corinne Invernizzi**, **Dinah Streifeneder**, **Oliver Salesov**, **Michaela Pongratz**, **Tanja Apfel**, **Katja Nuss**, **Sabine Koch**, **Käthi Kämpf**, **Karolin Kühn**, **Katrin Völter**, **Alexander Stahl**, **Birthe Pegel**, **Inga Plate**, **Kiki von Wedel**, **Friederike Ohle**, **Kristina Biermeier**, **Hannah Junge**, **Stephanie von Plocki**, **Dorothee Heidenreich**, **Sven Nielsen**.

Vielen Dank **Dinah** und **Stephi** für Eure tolle Unterstützung bei diesem sagenumwobenen Projekt.

Für die liebevolle und fürsorgliche Betreuung meiner treuen Wegbegleiterin **Sunny** möchte ich mich ganz herzlich bei **Käthi** bedanken.

Ein großes Merci an **Corinne** für die Durchsicht dieser Arbeit.

Vielen Dank an das **Anästhesie-Team** der Pferdeklinik, das **gesamte Team der Rinderklinik** sowie an die **Fahrer** des Tierspitals Zürich, ohne deren Hilfe die Durchführung der Operationen nicht möglich gewesen wäre.

Den **Tierpflegern** des Tierspitals Zürich sowie dem Ehepaar **Gottfried und Rösli Knüsel** vom Staffelegghof danke ich für die fürsorgliche Betreuung der Schafe.

Mein Dank geht ebenfalls an **Gabriele Schmid** und **Rainer Egle** für ihre geduldige Unterstützung bei administrativen Aufgaben und IT Fragen.

Ein großes und von ganzem Herzen kommendes Dankeschön geht an **Hubertus Streyl**, das **Praxisteam Dr. Winkler** und all **meine Freunde**, die mich bis hierhin begleitet haben und mir besonders in schweren Tagen eine große Stütze waren.

Ganz herzlich möchte ich mich bei **meinen Eltern** und **meinen Geschwistern** bedanken, mit deren Liebe, Hilfe und Unterstützung ich stets rechnen kann.

Meinem Freund **Hubertus Willeke** danke ich von ganzem Herzen für die Durchsicht der Arbeit und vor allem für die mir in allen Lebenslagen entgegengebrachte Toleranz und Liebe.

„Ganze Weltalter voll Liebe werden notwendig sein, um den Tieren ihre Dienste und Verdienste an uns zu vergelten.“ (Christian Morgenstern)

Lebenslauf

Name	Karina Klein
Geburtsdatum	23.03.1978
Geburtsort	Siegen, Deutschland
Nationalität	Deutsch
1985-1989	Grundschule Dreis-Tiefenbach
1989-1997	Evangelisches Gymnasium Weidenau
1997	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1997-2003	Studium der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen, Deutschland
März 2003	Erhalt der Approbation
2003-2006	Angestellte Tierärztin in der Kleintierpraxis Dr. G. Winkler Lohmar, Deutschland
2006-2008	Mitarbeit und Anfertigung der Dissertation in der Musculoskeletal Research Unit (MSRU), unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg am Departement Pferde der Vetsuisse- Fakultät
